

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/62, 15/65, 15/70, C07K 16/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/35022
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. September 1997 (25.09.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/01130

(22) Internationales Anmeldedatum: 15. März 1996 (15.03.96)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-
PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER
WISSENSCHAFTEN E.V., BERLIN [DE/DE]; Verwal-
tungsanschrift, Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MAURER, Jochen [DE/DE];
Pfleghofstrasse 10, D-72070 Tübingen (DE). JOSE, Joachim
[DE/DE]; Hartmeyerstrasse 48, D-72076 Tübingen (DE).
MEYER, Thomas, F. [DE/DE]; Spemannstrasse 30, D-
72076 Tübingen (DE).(74) Anwälte: WEICKMANN, H., usw.; Kopernikusstrasse 9, D-
81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, NZ, US,
europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: EXPORT SYSTEMS FOR RECOMBINANT PROTEINS

(54) Bezeichnung: EXPORTSYSTEME FÜR REKOMBINANTE PROTEINE

(57) Abstract

The present invention relates to vectors, host-vector combinations and processes for producing stable fusion proteins consisting of a carrier protein and a passenger protein. Expression of the fusion protein results in exposure of the passenger domains on the surface of bacterial cells, in particular *Escherichia coli*. If necessary, the passenger domains can be released into the medium by proteases, e.g. by selected host factors such as OmpT.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere *Escherichia coli* Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Türkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NZ	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	PL	Polen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PT	Portugal		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CN	China	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
DK	Dänemark	LR	Liberia				
EE	Estland						

Exportsysteme für rekombinante Proteine

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Vektoren, Wirt-Vektorkombinationen und Verfahren zur Herstellung von stabilen Fusionsproteinen bestehend aus einem Trägerprotein und einem Passagierprotein, wobei die Expression der Fusionsproteine
10 zur Exposition der Passagierdomänen auf der Oberfläche von Bakterienzellen, insbesondere Escherichia coli Zellen führt. Bei Bedarf können die Passagierdomänen durch Proteasen, z.B. durch ausgewählte Wirtsfaktoren, wie etwa OmpT in das Milieu freigesetzt werden.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft darüberhinaus die Verwendung von Trägerproteinen oder Trägerproteinanteilen aus natürlichen Proteinen, die als Aminosäuresequenzen in Datenbanken oder Dateien vorliegen und entsprechend ihrer Eigenschaften Autotransporter genannt werden.
20

Die vorliegende Erfindung ermöglicht Verfahren zur Identifizierung und Selektion von Bakterien, die mindestens ein Passagierprotein auf ihrer Oberfläche mit definierter Affinität
25 zu einem Bindungspartner exprimieren, sowie deren Verwendung für diagnostische Zwecke. Insbesondere erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von Peptid-Bibliotheken auf der Oberfläche von Bakterienzellen, mit deren Hilfe beispielsweise die Bestimmung des Liganden mit der höchsten Affinität bei Antikörpern, MHC-Molekülen oder anderen Komponenten des Immunsystems möglich ist.
30

Darüberhinaus ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren die Produktion von Fusionsproteinen, die sich aus Anteilen schwerer und leichter Antikörperdomänen und einem Autotransporter
35 zusammensetzen, und deren Transport durch die bakterielle Zellhülle. In einer spezifischen Ausführungsform wird letzt-

lich die zielgerichtete Varianz von bindungsaktiven rekombinanten Antikörpern und deren funktionelle Präsentation auf der Zelloberfläche von Escherichia coli möglich.

5 Generell erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Expression von rekombinanten Proteinen, die Rezeptoren oder Liganden sein können, auf der Bakterienoberfläche, sowie die Selektion aufgrund der Bindungsaffinität zu einem Bindungspartner, womit eine damit einhergehende Selektion eines klonalen
10 Produzenten möglich wird.

Erfindungsgemäß ist auch eine Verwendung von Bakterien, die Proteinfusionen auf der Zelloberfläche exprimieren und die gebunden an ein Trägermaterial oder in Lösung vorliegen, zur
15 gezielten Anreicherung oder Reinigung eines zu den Oberflächen-exponierten Proteindomänen Affinität zeigenden Bindungspartners. Darüberhinaus betrifft die vorliegende Erfindung auch die Oberflächenexpression von Enzymen oder anderen Proteinen mit biologisch, chemisch oder technisch relevanten
20 Eigenschaften, sowie, im Bedarfsfalle, deren gezielte Freisetzung in das umgebende Milieu.

Die Oberflächenexposition von rekombinanten Proteinen auf Bakterienzellen ist ein Verfahren mit einer Vielzahl von möglichen mikrobiologischen, molekularbiologischen, immunologischen oder technischen Anwendungen. Durch Produktion von rekombinanten Proteinen auf diese Art und Weise werden ihre Eigenschaften, z.B. Bindungsaffinitäten oder enzymatische Aktivitaten (Francisco et al., Bio.Technology 11 (1993) 491 -
30 495) zugänglich, ohne daß ein weiterer Schritt, wie beispielsweise der Aufschluß der Produzentenzelle notwendig ist. Da nur eine limitierte Anzahl von Faktoren natürlicherweise auf der Bakterienoberfläche exprimiert werden, ist zusätzlich eine spezifische Anreicherung des rekombinanten Proteins im Vergleich zu einer cytosolischen Produktion gegeben.
35 Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß man mit den gleichen Methoden, mit denen man das gesuchte rekombinante Pro-

tein selektioniert, auch den Produzenten dieses Proteins, eine Bakterienzelle isolieren kann, und somit einen klonalen Produzenten erhält, der dauerhaft gelagert, stabil reproduziert und in großem Maßstab vermehrt werden kann.

5

Für die Präsentation rekombinanter Proteine auf der Zelloberfläche wurden bisher verschiedene Systeme verwendet, die jedoch ausnahmslos auch natürlicherweise für den Transport oder die Sekretion bakterieller Oberflächenproteine dienen (Little
10 et al., TIBTECH 11 (1993), 3 - 5). Sinnvollerweise wurde dabei die DNA-Region, die natürlicherweise für das zu transportierende Protein, den Passagier, kodiert, ersetzt oder ergänzt durch die kodierende DNA-Region des gewünschten rekombinanten Proteines, wobei jedoch die kodierenden Bereiche der
15 für den Transport verantwortlichen Proteindomänen, die Trägerproteine, in der Regel unverändert blieben. Daraus wird deutlich, daß Systeme, in denen Passagier- und Trägerkomponente unmittelbar benachbart oder in einem Gen kodiert vorliegen, sogenannte Ein-Komponenten-Systeme, einen erheblichen
20 Vorteil gegenüber Systemen mit mehreren, unabhängigen Komponenten (Gentshev et al., Behring Inst. Mitt. 95 (1994) 57 - 66) haben, insbesondere bei der Herstellung von universell verwendbaren Vektoren, die neben der Eigenschaft zur stabilen Replikation, einem oder mehreren Selektionsmarkern, den für
25 den Transport notwendigen Proteindomänen, auch eine Insertionsstelle für das den Passagier kodierende DNA-Fragment enthalten müssen. Als Trägerproteine in vielen bisher verwendeten Ein-Komponenten-Systemen wurden Proteine der äußeren Membran von E. coli verwendet. Dazu gehören unter anderem
30 LamB (Charbit et al., Gene 70 (1988), 181 - 189), PhoE (Agterberg et al., Gene 59 (1987) 145 - 150) oder OmpA (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717), deren Verwendung jedoch Nachteile bergen. So können zusätzliche Proteinsequenzen nur in oberflächenexponierten Schleifen
35 integriert werden, was einmal zu fixierten amino- und carboxyterminalen Enden an den einrahmenden Trägerproteinsequenzen führt und zum anderen sich limitierend auf die Länge

der einzubringenden Sequenzen auswirkt. Die Verwendung des Peptidoglykan assoziierten Lipoproteins (PAL) als Trägerprotein führt zwar zum Transport zur äußeren Membran, eine Präsentation nativer Proteinsequenzen auf der Oberfläche von E.coli ist damit jedoch nicht möglich (Fuchs et al., Bio.Technology 9 (1991), 1369 - 1372). Eine Oberflächenexpression größerer Proteine ist möglich unter Verwendung einer Fusion aus OmpA und Lpp als Trägerproteinanteil, an deren Carboxylende die Passagierproteinsequenzen angehängt werden (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci (1992), 2713 - 2717). Dabei ist als Nachteil in Kauf zu nehmen, daß die Fixierung des N-Terminus des Passagiers eine korrekte Faltung oder Funktion verhindern kann.

Weiterhin sind sogenannte Autotransporter enthaltende Proteine bekannt, eine Familie von sekretierten Proteinen in Gram-negativen Bakterien. In der Publikation Jose et al. (Mol.Microbiol. 18 (1995), 377-382) werden einige Beispiele für solche Autotransporterproteine genannt. Diese Proteine enthalten eine Proteindomäne, die den Transport einer N-terminalen angehängten Proteindomäne durch eine aus β -Faltblattstrukturen gebildete Porenstruktur in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien ermöglicht. Die Autotransporter enthaltenden Proteine werden als sogenanntes Poly-Protein-Vorläufermolekül synthetisiert. Der typische Aufbau eines solchen Vorläuferproteins ist dreigeteilt. Am N-Terminus befindet sich eine Signalsequenz, die verantwortlich ist für den Transport durch die innere Membran, unter Inanspruchnahme des im Wirt vorhandenen Sec-Transportapparates und die dabei abgetrennt wird. Daran schließt sich die zu sekretierende Proteindomäne an, gefolgt von einer C-terminalen Helferdomäne, die eine Pore in der Außenmembran bildet, wodurch die N-terminal angehängte zu sekretierende Proteindomäne an die Oberfläche transloziert wird. Dort bleibt diese in Abhängigkeit ihrer auszuübenden Funktion mit dem nun als Membrananker dienenden Helfer an der Bakterienoberfläche verbunden oder wird durch proteolytische Aktivität abgetrennt, wobei diese pro-

teolytische Aktivität der zu sekretierenden Proteindomäne innewohnen kann oder eine vom Wirt ausgehende Eigenschaft sein kann oder eine externe/gezielt zugesetzte Aktivität (z.B. Thrombin, IgA-Protease) sein kann. Die Sekretion heterologer Polypeptide bzw. Proteine unter Verwendung eines auf einem Autotransporter basierenden Expressionssystems ist bekannt. So ist beispielsweise aus EP-A-0 254 090 oder der Publikation Klauser et al. (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) bekannt, daß die Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* heterologe Polypeptide als Passagierdomänen in den heterologen Bakterienstämmen *E.coli* und *Salmonella typhimurium* exprimieren kann.

Weiterhin ist der extrazelluläre Transport des Proteins VirG von *Shigella* bei Suzuki et al. (J.Biol.Chem. 270 (1995), 30874-30880) beschrieben. Bei diesem Protein handelt es sich ebenfalls um einen IgA-Protease-ähnlichen Autotransporter, der zur Expression fremder Polypeptide wie etwa MalE und PhoA in der Lage ist, die kovalent an den N-Terminus der Autotransporterdomäne von VirG verknüpft wurden. Weiterhin wird in der Arbeit Shimada et al. (J.Biochem. 116 (1994), 327-334) der extrazelluläre Transport eines heterologen Polypeptids, nämlich Pseudoazurin aus *A. faecales* in *E.coli* unter Verwendung der Autotransporterdomäne der Serinprotease von *S. marcescens* beschrieben.

Bei den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Herstellung zur Expression heterologer Passagierproteine mit Hilfe von Autotransportersystemen wurden jedoch erhebliche Nachteile festgestellt. So treten bei Verwendung der Transporter- bzw. Helferdomäne der IgA-Protease aus *N. gonorrhoeae* in *E.coli* als Wirtstamm häufig erhebliche Kompatibilitätsprobleme auf. Zu starke Expression führt zur Zell-Lyse oder die Bakterien zeigen ein vermindertes Wachstum auch bei mittlerer Expression, was in beiden Fällen zu einer erheblich verminderten Fusionsproteinausbeute führt und auf Schwächen in der Stabilität des Systems hinweist. Der vorliegenden Erfindung

lag also das technische Problem zugrunde, Trägerproteine bereitzustellen, die insbesondere bei Verwendung von E.coli als Wirtsstamm nicht zu diesen Nachteilen führen, da aus vielerlei Gründen E.coli als Wirtsstamm gegenüber z.B. Neisseria gonorrhoeae vorzuziehen ist. Zum einen lassen sich E.coli Stämme mit rekombinanter DNA schon in einfachen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 anziehen. Darüberhinaus wird bereits mit E.coli Stämmen in der kommerziellen Produktion rekombinanter Proteine gearbeitet. Dies bedeutet einen erheblichen Vorteil im Umgang und in der Handhabung von rekombinanten E.coli Stämmen im Vergleich zu anderen Wirtsstämmen. Darüberhinaus gibt es von E.coli bereits eine große Anzahl genau charakterisierter Mutantenstämme, die in Abhängigkeit der gewünschten Anwendung eine Auswahl des Wirtsstammes zulassen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Polypeptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbakterien, wobei man,

(a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

- (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungsstelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,
- (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und
- (v) einen für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt; und

(b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert, bei denen eine Expression der fusionierten Nukleinsäuresequenz und eine Präsentation des von dem Nukleinsäureab-

- 7 -

schnitt (ii) kodierten Peptids oder Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

10 Durch die Verwendung eines Wirtsbakteriums, welches gegenüber dem für die Transporterdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, kann überraschenderweise eine gegenüber dem Stand der Technik deutlich verbesserte Oberflächenpräsentation von Peptiden oder und Polypeptiden, insbesondere auch
15 von kurzen synthetischen Peptiden mit einer Länge von vorzugsweise 4 - 50 Aminosäuren bzw. von eukaryontischen Polypeptiden erreicht werden.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird ein Wirtsbakterium bereitgestellt, das mit einem bzw. mit mehreren kompatiblen rekombinanten Vektoren transformiert ist. Ein solcher Vektor enthält in operativer Verknüpfung mit einem Promotor und gegebenenfalls weiteren für die Expression erforderlichen Sequenzen eine fusionierte Nukleinsäuresequenz. Diese fusionierte Nukleinsäuresequenz umfaßt (i) einen Signalpeptid-kodierenden Abschnitt, vorzugsweise einen Abschnitt, der für ein Gram-negatives Signalpeptid kodiert, welches den Durchtritt durch die innere Membran in das Periplasma ermöglicht. Weiterhin umfaßt die fusionierte Nukleinsäuresequenz (ii)
25 einen für das zu präsentierende Passagierpeptid bzw. Polypeptid kodierenden Abschnitt. Gegebenenfalls befindet sich 3'-seitig von diesem Abschnitt (iii) ein für eine Proteaseerkennungsstelle kodierender Nukleinsäureabschnitt. Beispiele für geeignete Proteaseerkennungsstellen sind Erkennungsstellen
30 für intrinsische, d.h. natürlicherweise in der Wirtszelle vorhandene oder extern zugeführte Proteasen. Beispiele für extern zugeführte Proteasen sind die IgA-Protease (vgl. z.B.

EP-A-0 254 090), Thrombin oder Faktor X. Beispiele für intrinsische Proteasen sind OmpT, OmpK oder Protease X. 3'-seitig von diesem Abschnitt befindet sich (iv) ein für einen Transmembranlinker kodierender Nukleinsäureabschnitt, der
5 eine Präsentation des von Abschnitt (iii) kodierten Peptids oder Polypeptids auf der Außenseite der äußeren Membran des Wirtsbakteriums ermöglicht. 3'-seitig dieses Abschnitts ist ein für eine Transporterdomäne eines Autotransporters kodierender Nukleinsäureabschnitt.

10

Besonders bevorzugt werden Transmembranlinkerdomänen verwendet, die homolog bezüglich des Autotransporters sind, d.h. die Transmembranlinkerdomänen werden von Nukleinsäureabschnitten direkt 5'-seitig der Autotransporterdomänen ko-
15 diert. Die Länge der Transmembranlinker ist vorzugsweise 30 - 160 Aminosäuren.

Die Transporterdomäne ist in der Lage, in der Außenmembran des Wirtsbakteriums ein sogenanntes β -Faß auszubilden. Das
20 β -Faß besteht aus einer geraden Anzahl antiparalleler, amphipatischer, β -Faltblätter. Diese Struktur besitzt wie andere Proteine der Außenmembran Gram-negativer Bakterien am C-Terminus eine aromatische Aminosäure wie Phenylalanin oder Tryptophan. Darauf folgen abwechselnd geladene (polare) und un-
25 geladene (hydrophobe) Aminosäuren, eine Struktur, die eine Rolle bei der Faltung mit der Membran zu spielen scheint. Die Anzahl und Lage der amphipatischen, β -Faltblätter lassen sich mit Hilfe eines geeigneten Computerprogrammes identifizieren und mit Hilfe von Analogien zu den Außenmembranporinen, von
30 denen die Kristallstruktur bekannt ist (Cowan et al., Nature 358 (1992) 727 - 733), zur Konstruktion eines Modells der Faßstruktur verwenden. Vorzugsweise ist die Faßstruktur aufgebaut wie folgt: 9-14, insbesondere ca. 12 Aminosäuren (AS) für einen Membrandurchgang; keine oder eine minimale Anzahl
35 geladener AS zeigen in einem β -Faltblatt nach außen; kleine oder gar keine Schleifen zeigen nach innen, gegebenenfalls zeigen große oder sehr große Schleifen nach außen; das β -Faß

setzt sich aus 12, 14, 16 oder 18, insbesondere aus 14 anti-
parallelen β -Faltblättern zusammen.

Ausgehend von dem Modell des Fasses kann nun der für den
5 Selbsttransport durch die Außenmembran notwendige Bereich
festgelegt werden und mit einem Signalpeptid und einer Passa-
gierdomäne auf genetischer Ebene verknüpft werden. Die
Expression dieses Konstruktes ermöglicht dann den Transport
des Passagierproteins zur Bakterienoberfläche, wobei das Si-
10 gnalpeptid ursprünglich von dem Passagier oder einem anderen
Protein stammen kann. Dabei muß berücksichtigt werden, daß
zugehörig zu dem β -Faß eine in der Länge und Sequenz geeig-
nete Linkerregion mit verknüpft wird, die durch die gebildete
Pore durchreicht und dafür sorgt, daß die Passagierdomänen
15 vollständig an der Oberfläche exponiert sind.

Ein wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Verfahrens
ist, daß das Wirtsbakterium gegenüber dem für die Transpor-
terdomäne kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist, d.h.
20 die Wirtszelle und die Transporterdomäne werden aus homologen
Familien, z.B. Enterobakterien, vorzugsweise aus homologen
Gattungen, z.B. Escherichia, Salmonella oder Helicobacter,
besonders bevorzugt aus homologen Spezies, z.B. Escherichia
coli, Salmonella typhimurium ausgewählt. Besonders bevorzugt
25 werden Salmonella oder E.coli als Wirtsbakterium und eine
ebenfalls aus Salmonella oder E.coli stammende Transporterdo-
mäne oder eine Variante davon verwendet.

Als besonders geeigneter E.coli Wirtsstamm sei hier der Stamm
30 JK321 (DSM 8860) genannt, der ompT⁻, dsbA⁻ ist und den gene-
tischen Marker fpt trägt, was zu einer stabilen Oberflächen-
expression auch großer Proteine, wie z.B. der V_h-Kette eines
Antikörpers mit Hilfe des igaß-Helferproteins führt.

35 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende
Erfindung daher ein Trägerprotein, das eine Autotransporter-
funktion ausübt, und eine Oberflächenexposition von rekombi-

nanten Proteine in *Escherichia coli* mit hoher Ausbeute ermöglicht. In einem typischen Beispiel handelt es sich dabei um den Autotransporter des "adhesin-involved-in-diffuse-adherence" (AIDA-I) aus *E.coli* (Benz und Schmidt, *Infect. Immun.* 57 (1989), 1506 - 1511). Die Transporterdomäne des AIDA-I-Proteins ist in Fig. 2 dargestellt. Neben dieser spezifischen Sequenz können auch Varianten davon verwendet werden, die beispielsweise durch Veränderung der Aminosäuresequenz in den nicht am Membrandurchgang beteiligten Schleifenstrukturen erzeugt werden können. Gegebenenfalls können die für die Oberflächenschleifen kodierenden Nukleinsäureabschnitte auch vollständig deletiert werden.

Auch innerhalb der amphipatischen β -Faltblattstrukturen können konservative Aminosäureaustausche, d.h. der Austausch einer hydrophilen durch eine andere hydrophile Aminosäure oder/und der Austausch einer hydrophoben durch eine andere hydrophobe Aminosäure vorgenommen werden. Vorzugsweise hat eine Variante eine Homologie von mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % zu der in Fig. 2 angegebenen Sequenz der AIDA-I Autotransporterdomäne zumindest im Bereich der β -Faltblattstrukturen.

In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei dem verwendeten Autotransporter um den des SepA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 123 - 135) oder eine Variante davon. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des IcsA-Proteins aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., *J. Bacteriol.* 175 (1993), 2189-2196) oder des Tsh-Proteins aus *E.coli* (Provence et al., *Infect. Immun.* 62 (1994), 1369-1380). In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich um den Autotransporter des Hsr-Proteins aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., *Mol. Microbiol.* 11 (1994), 349-361), des Prn-Proteins aus *Bordetella ssp.* (Charles et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989), 3554-3558; Li et al., *J. Gen. Microbiol.* 138 (1992), 1697-1705), des Ssp-Proteins aus *Serratia*

- 11 -

marcescens (z.B. Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944 oder Genbank-Accessionnr. X59719, D78380), des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae (StGeme et al., Mol. Microbiol. 14 (1994), 217-233), des BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect.Immunol. 62 (1994), 4727-4738), des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori (Schmitt und Haas, Mol.Microbiol. 12 (1994), 307-319) oder verschiedener Proteine aus Rickettsien (z.B. 190kDa Zelloberflächenantigene, Genbank-Accessionnr. M31227; SpaP, Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241; rOmpB, Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370 und Slp T, Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133) bzw. eine - wie vorstehend definierte - Variante davon.

- 15 Die DNA-Sequenzen und die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der zuvor genannten Autotransporter sind in den Figuren 7-24 dargestellt.

Weitere Autotransporterdomänen in bakteriellen Oberflächenproteinen oder in sekretierten bakteriellen Proteinen können aus in Datenbanken vorliegenden Proteinsequenzen aus in Proteinsequenzen, die auf in Datenbanken verfügbaren DNA-Sequenzen basieren, oder aus durch Sequenzanalyse direkt oder indirekt über die DNA-Sequenz bestimmten Proteinsequenzen abgeleitet werden. Die entsprechenden kodierenden Regionen (Gene) können zur Herstellung von Vektoren oder Fusionsproteingenen, die eine effektive Oberflächenexpression von Passagierproteinen in Gram-negativen Bakterien, insbesondere E.coli ermöglichen, verwendet werden.

30

Oberflächenpräsentation bzw. -exposition bedeutet erfindungsgemäß, daß die Fusionsproteine bzw. Passagierdomänen auf der dem Medium zugewandten Seite der äußeren Bakterienmembran lokalisiert sind. Oberflächenexponierte Passagierproteine sind in intakten Gram-negativen Bakterien frei zugänglich für Bindungspartner.

35

In einer bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung also die Oberflächenpräsentation von Peptiden oder in einer weiteren Ausführungsform die Oberflächenpräsentation von Peptidbibliotheken in Gram-negativen Bakterien, insbesondere in E.coli und deren Verwendung zur Bestimmung der Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor bzw. zur Epitopkartierung. Epitopkartierung bedeutet, daß das Peptid mit der höchsten Affinität zu einem Antikörper oder einem anderen Rezeptor oberflächenexponiert auf dem produzierenden Stamm identifiziert wird. Dabei wird ein entscheidender Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen (Makowski, Gene 128 (1993), 5 - 11) zur Expression von Peptidbibliotheken deutlich. In dem erfindungsgemäßen bakteriellen System erfolgt mit der Identifizierung eines die gewünschten Eigenschaften tragenden Peptides gleichzeitig die Selektion des klonalen Produzenten. Dieser kann unmittelbar vermehrt werden und zur Produktion größerer Mengen des gewünschten Peptides verwendet werden, ohne daß wie im Phagensystem aufwendige Zyklen von Infektion (Phagenvermehrung) und Selektion (Phagenauswahl) notwendig sind. Gleichzeitig mit der Vermehrung des das korrekte Peptid oberflächenexponiert exprimierenden Stammes erfolgt eine Amplifikation des entsprechenden kodierenden Gens, dessen Sequenzanalyse eine eindeutige Identifizierung und Charakterisierung des Peptids mit einfachen und etablierten Techniken erlaubt. Diese erfindungsgemäßen Vorteile treffen auf alle mit der vorliegenden Erfindung oberflächenexponiert exprimierten Passagierdomänen, d.h. Peptide und Polypeptide zu.

Eine erfindungsgemäß hergestellte Peptidbibliothek enthält also Fusionsproteine, zusammengesetzt aus einem Autotransporter, in einer besonders bevorzugten Variante aus dem AIDA Autotransporter, und einem Peptid, das in einem Gram-negativen Bakterium, bevorzugt E.coli oberflächenexponiert produziert wird. Die hohe Varianz an verschiedenen exprimierten Peptiden ergibt sich in einem typischen Beispiel durch die Klonierung von degenerierten, synthetisch hergestellten Oli-

gonucleotiden zwischen die kodierenden Regionen für das Signalpeptid und den Autotransporter.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Expression von als Antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, bevorzugt von *E.coli*. Die Konstruktion eines derartigen Fusionsproteins erfolgte erfindungsgemäß unter Verwendung der β -Untereinheit des Toxins von *Vibrio cholerae* (CtxB) als Passagier und dem AIDA Autotransporter als Trägerprotein. Die Zugänglichkeit der oberflächenexponierten antigenen Domänen für in Frage kommende Bindungspartner wurde erfindungsgemäß nachgewiesen durch Markierung mit einem für CtxB spezifischen Antiserum. Dabei zeigte sich, daß die rekombinanten, in die Außenmembran des *E.coli* Wirtstammes eingelagerten Fusionsproteine bis zu 5 % des Gesamtzellproteins ausmachen können, was eine erheblich verbesserte Effizienz im Vergleich zu anderen Systemen bedeutet. Das hier beschriebene Verfahren ermöglicht somit die stabile Produktion und Präsentation von antigen wirkenden Proteinen oder Proteinfragmenten auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien und in einer bevorzugten Ausführungsform deren Verwendung als Lebendvakzine, zur oralen Vakzinierung oder zum Screening von Seren oder Antikörperbanken. Die Verwendung von Bakterienzellen, beispielsweise attenuierten *Salmonella* Stämmen (Schorr et al., Vaccine 9 (1991) 675-681), mit oberflächenexponiert exprimierten antigen wirkenden Proteinen hat sich bei der Lebendvakzinierung als vorteilhaft gegenüber der intrazellulären bakteriellen Expression von Antigenen erwiesen.

Generell erlaubt die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die Oberflächenexpression aller Passagiere, die in ihrem wesentlichen Bestandteil Peptide oder Proteine sind auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, insbesondere *E.coli*.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dient die C-terminale Domäne des AIDA Proteins, der AIDA Autotransporter, als Membrananker zur Präsentation rekombinanter Polypeptide des Immunsystems, z.B. rekombinanter Antikörperdomänen auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien. Die Oberflächenexpression von rekombinanten Antikörperfragmenten ermöglicht deren rasche Modifizierung wie auch die Bewertung und Untersuchung ihrer Antigen-bindenden Eigenschaften. So wird es möglich ganze Bibliotheken von funktionellen Antikörperfragmenten oberflächenexponiert zu produzieren und auf bestimmte vorgegebene Bindungseigenschaften oder Affinitäten hin zu testen. Der Vorteil der vorliegenden Erfindung gegenüber den bisher verwendeten Phagensystemen liegt darin, daß die Variation, d.h. die genetische Manipulation und die Produktion des Proteins in demselben Wirtsorganismus erfolgen kann. Dabei kann die genetische Manipulation eine gezielte sein (ortsspezifische Mutagenese) oder eine zufällige, unter Verwendung von degenerierten Oligonukleotiden zur Synthese einer intakten Fusion aus Antikörper-kodierendem Fragment als Passagier und dem Autotransporter als Trägerprotein. Ebenso kann die genetische Manipulation in Form von in vivo-Mutagenese erfolgen, indem man die Bakterien, die das Gen für das Fusionsprotein enthalten, energiereicher Strahlung (z.B. UV) oder chemischen, mutagen wirkenden Agenzien aussetzt.

Die erfindungsgemäße Selektion des Moleküls mit den korrekten Bindungseigenschaften geht einher mit der Selektion der produzierenden Bakterienzelle. Daraus wird ersichtlich, daß diese erfindungsgemäße Verfahrensweise in ihrer Strategie bestehend aus Variation und nachfolgender Selektion der natürlichen Strategie des Immunsystems zur bestmöglichen Anpassung von Bindungseigenschaften immunogener Moleküle angelehnt ist. Zur Expression funktioneller Antigen-bindender Teile von Antikörpern, die gewöhnlich nicht glykosyliert werden, auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, vorzugsweise E.coli sind verschiedene erfindungsgemäße Vorgehensweisen denkbar. Zwei monovalente Fragmente können zusammen präsen-

tiert werden durch getrennte Fusionen der leichten Kette (VL) und der schweren Kette (VH) mit jeweils einer Autotransporterdomäne, die unabhängig voneinander mit verschiedenen kompatiblen Vektoren oder unter Kontrolle verschiedener Promotoren auf dem gleichen Vektor in einer Wirtszelle exprimiert werden. Auf der Oberfläche lagern sich beide oberflächenexponiert vorliegenden Antikörperdomänen zu einem funktionellen Fv-Fragment zusammen, wobei die Stabilität der Interaktion durch eine chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung oder anders geartetes chemisches cross-linking gefördert werden kann.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Vorgehensweise werden Fusionsproteine hergestellt, die den Autotransporter als Trägerprotein enthalten, und als Passagier die leichte Kette (VL) und die schwere Kette (VH) einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers, verknüpft über ein kurzes Linker-Peptid (z.B. [Gly₄Ser]₃), das eine korrekte Zusammenlagerung der beiden Ketten zu einem funktionellen Fv-Fragment erlaubt. Bei der Konstruktion solcher single-chain (sc) Fv-Fragmente ist sowohl eine Verknüpfung des N-Terminus der leichten Kette mit dem C-Terminus der schweren Kette, wie auch eine Verknüpfung des N-Terminus der schweren Kette mit dem C-Terminus der leichten Kette möglich (Pluckthun Immun. Rev. 130 (1992), 151 - 188). Mit den beschriebenen Vorgehensweisen ist auch die Produktion eines kompletten Fab-Fragmentes möglich.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die oberflächenexponierte Expression von MHC-Klasse II Molekülen in E.coli gegebenenfalls mit definierten eingelagerten Peptiden. Dabei sind zwei Strategien denkbar. In der einen Variante werden zwei verschiedene Fusionsproteine, die beide einen Autotransporter als Trägerprotein enthalten, auf getrennten kompatiblen Vektoren oder auf einem Vektor unter Kontrolle unterschiedlicher Promotoren in einer Wirtszelle exprimiert. Als Passagierprotein dient einmal die α -Kette des gewünschten MHC-Klasse II Subtyps und zum

- 16 -

anderen die β -Kette dieses Subtyps, an deren N-Terminus über einen Linker das gewünschte Peptid angehängt sein kann (Kozono et al., Nature 369 (1994) 151-154).

- 5 In der zweiten Variante wird ein Passagierprotein bestehend aus dem Peptid, der β -Kette und der α -Kette mit einem Auto-transporter fusioniert. Auf der Bakterienoberfläche lagern sich die α - und β -Kette zu einem funktionellen MHC-Molekül zusammen, wobei das Peptid sich korrekt in die Bindungsgrube
10 einlagert. Die Stabilität des Komplexes kann durch chemisch induzierte Disulfidbrückenbildung unterstützt werden. Die Variation des eingelagerten Peptides ist möglich durch ortsspezifische Mutagenese oder/und durch den Einsatz von degenerierten Oligonukleotidprimern bei der Herstellung der die
15 Fusionsproteine kodierenden DNA-Fragmente, ebenso wie durch in vivo-Mutagenese Methoden unter Verwendung von energiereicher Strahlung oder/und chemischen Mutagenen.

Auch hier wird noch einmal der Vorteil des erfindungsgemäßen
20 Verfahrens deutlich. Variation des Bindungspartners, Expression, Selektion des Moleküls mit den optimalen Eigenschaften, Sequenzanalyse und stabile Produktion kann in einem Wirtstamm erfolgen. Damit wird beispielsweise auch eine rasche Charakterisierung von Varianten bereits bekannter Liganden mit bes-
25 seren Bindungseigenschaften möglich und damit eine Liganden- oder Rezeptoroptimierung.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung die Oberflächenexpression von immunmo-
30 dulatorischen Rezeptoren wie beispielsweise CD1, Fc-Rezeptor oder MHC-Klasse I Molekülen, sowie deren gezielte Variation.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vor-
liegende Erfindung die Oberflächenexpression von T-Zellrezept-
35 toren oder Teilen davon, aber auch von weiteren Oberflächen-antigenen eukaryontischer Zellen oder Zellen des Immunsystems.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die oberflächensexprimierten Proteinfragmente oder Peptide T-Zellepitope, die im Anschluß an die Aufnahme der Bakterien durch adäquate Zelllinien oder Primärzellen, wie z.B. Makrophagen
5 als in MHC-Moleküle der Klasse I oder II eingelagerte Peptide präsentiert werden und zur Stimulation spezifischer T-Zellen dienen können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ermöglicht das
10 erfindungsgemäße Verfahren die Oberflächenexpression und die Variation eines Peptids oder Polypeptids mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, eines Liganden, eines Rezeptors, eines Antigens, eines Toxin-bindenden Proteins, eines Proteins mit enzymatischer Aktivität, eines Nukleinsäure-bindenden
15 Proteins, eines Inhibitors, eines Chelator-Eigenschaften habenden Proteins, eines Antikörpers oder einer Antigen-bindenden Domäne eines Antikörpers.

Unter dem Begriff "Bindungspartner" wird erfindungsgemäß ein
20 Element, ein Molekül, eine chemische Verbindung oder ein Makromolekül verstanden, wobei der Bindungspartner und/oder die, die Fusionsproteine exprimierenden Bakterienzellen frei löslich, gebunden an eine Matrix oder aber assoziiert mit einer biologischen Membran vorliegen.

25

Der Begriff "Antigen bindende Domäne" bezeichnet erfindungsgemäß mindestens den Bereich eines Antikörpermoleküls, der hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ermöglicht die vorliegende Erfindung eine chemische, physikalische oder/und enzymatische Modifikation des oberflächensexponierten Passagierpeptids bzw. -polypeptids oder Teilen davon, wobei die Modifikation eine kovalente Modifikation, eine nicht-kovalente
35 lente Modifikation, eine Glykosilierung, eine Phosphorylierung oder eine Proteolyse sein kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden und zur Identifizierung von Bakterien, die Peptide bzw. Polypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, gliedert
5 sich in folgende Schritte:

- (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der Transporterdomäne eines Autotransporters und eines Signalpepti-
10 des, wobei die einzelnen Teilfragmente über PCR amplifiziert oder aus Restriktionsverdauungen anderer DNA stammen können, in mindestens einen Vektor;
- 15 (2) Variieren des Passagiers durch Mutagenese z.B. durch ortsspezifische Mutagenese, Verwendung von degenerierten Oligonukleotidprimern in der PCR, durch chemische Mutagenese oder durch Verwendung energiereicher Strahlung;
- 20 (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien;
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in den Wirtsbakterien, die das Fusionsprotein oder die Fusionsproteine stabil an der Oberfläche präsentieren.
25
- (5) Kultivieren der Bakterien z.B. in Flüssigkultur oder auf Agarplatten zur Produktion des stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiere;
30
- (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen und
35
- (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.

Dabei kann erfindungsgemäß dieses Verfahren mehrmals durch-
laufen werden, um die Eigenschaften des oberflächenexponier-
ten Peptids bzw. Polypeptids schrittweise dem gewünschten
Bindungsverhalten anzupassen oder in einem ersten Schritt den
5 Bindungspartner bezüglich einer Eigenschaft zu optimieren und
in einem zweiten Schritt bezüglich einer oder mehrerer ande-
rer Eigenschaften. Erfindungsgemäß können aber auch in Abhän-
gigkeit der gewünschten Anwendung auch nur einzelne Teil-
schritte des Verfahrens miteinander verknüpft werden, in ei-
10 nem typische Beispiel die Teilschritte (1), (3), (4) und (5),
aber auch alle anderen möglichen Kombinationen.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens ent-
hält das Fusionsprotein als Trägerprotein die Autotranspor-
15 terdomäne des AIDA Proteins oder eine Variante davon, die
eine Sezernierung des Fusionsproteines ermöglicht.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieses Verfah-
rens enthält das Fusionsprotein als Trägerprotein den SepA
20 Autotransporter oder einen Teil davon, oder den IcsA
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Tsh
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Ssp
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hap
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Prn
25 Autotransporter oder einen Teil davon, oder den Hsr
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den BrkA
Autotransporter oder einen Teil davon, oder den VacA
Autotransporter oder einen Teil davon oder einen Rickettsia-
Autotransporter oder einen Teil davon,
30 die jeweils die Sezernierung des Fusionsproteines
ermöglichen.

Die Expression multimerer Proteine wird erfindungsgemäß mö-
glich durch Herstellung verschiedener Fusionsproteine in ei-
35 ner Zelle, die sich auf der Oberfläche zu einer funktionellen
Einheit zusammenlagern.

- 20 -

Die geringe Generationszeit der als Wirtsorganismen verwendbaren Bakterien ermöglicht einen permanenten Zyklus von Variation und Selektion, der eine evolutionsartige Anpassung des Passagierpoteins, aber auch des Autotransporters an vorgegebene Eigenschaften ermöglicht. Dabei kann es sich in einem typischen Beispiel um Bindungsaffinitäten zwischen dem Passagierprotein und einem Bindungspartner handeln. Die Isolierung der Bakterien mit dem stabil exponierten Fusionsprotein erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner, z.B. einen Matrix-fixierten Bindungspartner, an einen Fluoreszenz-markierten Bindungspartner, einen Magnetpartikel-markierten Bindungspartner oder einen chromogen markierten Bindungspartner. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Bindungspartner so modifiziert, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner detektiert werden kann.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von stabil exprimierten Fusionsproteinen oder Teilen davon oder von Bakterien mit stabil auf der Oberfläche exprimierten Fusionsproteinen und deren Verwendung für therapeutische Zwecke oder diagnostische Zwecke, bei der Schadstoffanreicherung oder Entfernung, bei der Inaktivierung von Toxinen, bei der Rohstoffmobilisierung, bei der Lebensmittelherstellung oder -verarbeitung, bei der Waschmittelherstellung, bei der Markierung von ausgesuchten eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen. Erfindungsgemäß können Antikörper oder Antikörperfragmente stabil auf der Oberfläche exprimierende Bakterien, in einem typischen Beispiel unter Verwendung des AIDA Autotransporters als Transporterdomäne zur Produktion derselben verwendet werden, wobei diese Antikörper oder Antikörperfragmente anschließend, gegebenenfalls nach einer Aufreinigung für diagnostische oder therapeutische Zwecke eingesetzt werden. Mit solchen Antikörpern oder Antikörperfragmenten wäre es beispielsweise möglich, Zellen mit

bestimmten Oberflächenmarkern, als typisches Beispiel seien hier Tumorantigene genannt, spezifisch zu bezeichnen oder zu selektionieren. In einem weiteren typischen Beispiel handelt es sich bei den markierten Oberflächenmarkern um Rezeptoren, wobei die Markierung einhergeht mit der Blockierung der oder einer der Rezeptoreigenschaften, womit eine gezielte Inhibition einer durch den Rezeptor ausgelösten oder vermittelten Signaltransduktion und der damit verbundenen Zellfunktion möglich wird.

10

Beschreibung der Figuren

Figur 1:

Hydrophobizität der C-terminalen 300 Aminosäuren des AIDA-I Proteins.

Die für Autotransporter typische Pore in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien wird gebildet durch amphipatische β -Faltblattstrukturen, d.h. von Domänen mit β -Faltblattstruktur und alternierend hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren. Dies kann man sichtbar machen, indem man einen relativen Hydrophobizitätswert der Aminosäure, der mittels eines bestimmten Algorithmus der Aminosäure zugeordnet wurde, gegen die Position der Aminosäure aufträgt. Es wurde der Algorithmus von Vogel und Jähnig (J. Mol Biol. 190 (1986) 191-199) verwendet. Die Pfeile zeigen die möglichen Membrandurchgänge an, wobei Pfeil nach links bedeutet, daß der Membrandurchgang von innen nach außen verläuft und Pfeil nach rechts Membrandurchgang von außen nach innen anzeigt. SP deutet eine relative Oberflächenwahrscheinlichkeit der Aminosäuren berechnet nach Emini et al. (J. Virol. 55 (1985), 836-839) an.

Figur 2:

Modell des Autotransporters aus dem AIDA-I Protein.

Ausgehend von der Auftragung der relativen Hydrophobizität einer Aminosäure gegen ihre Position (Figur 1) läßt sich die durch die antiparallelen, amphipatischen β -Faltblätter gebildete Faßstruktur als Modell darstellen. Die hier dargestellte

- 22 -

aufgeschnittene Faßstruktur, wird in der Membran durch Interaktion des ersten mit dem antiparallelen letzten Membrandurchgang geschlossen. Die in Rauten geschriebenen Aminosäuren befinden sich im Membranbereich, wobei fett umrandete relativ hydrophob sind und zur Außenseite des Faßes, also zur Membran hin orientiert sind, während dünn umrandete relativ hydrophil sind und mit ihren Seitenketten zur Innenseite der Pore hin zeigen. In Kreisen gezeichnete Aminosäuren bilden Schleifen außerhalb der Membran. Alanin an Position 1 des Modells trägt in der vollständigen Sequenz von AIDA-I die Nummer 1014, während das terminale Phenylalanin in der vollständigen Sequenz die Nummer 1286 trägt (Benz und Schmidt, Mol Microbiol 11 (1992), 1539-1546).

Figur 3 a:

Herstellung von pJM7, eines Vektors zur Oberflächenexpression von CtxB.

pJM7 enthält eine Genfusion (FP59) aus dem Cholera-toxin B und der AIDA-Linker-/ β -Faß-Region. Diese Genfusion wird unter der Kontrolle des künstlichen Promotors PTK (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) in einem Vektor mit hoher Kopienzahl konstitutiv exprimiert. Das ctxB-Gen wurde mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 aus dem Plasmid pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) durch PCR amplifiziert. Der Autotransporter, bestehend aus dem β -Faß und der Linkerregion aus AIDA-I wurde durch Amplifikation mit den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmid-DNA-Präparation von E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) amplifiziert. Das Oligonukleotid JM 1 enthält in seinem 5'-Überhang eine BglII-Erkennungssequenz, die Oligonukleotide JM6 und JM7 enthalten je eine KpnI-Erkennungssequenz. Die Vektor-DNA (pE) wurde mit ClaI und BamHI hydrolysiert und die beiden PCR Produkte wurden im Anschluß an die Amplifikation mit ClaI und KpnI (EF16/JM6-Fragment) bzw. mit BglII und KpnI (JM7/JM1-Fragment) nachgeschnitten. Die so generierten drei Fragmente wurden in einer Ligation kondensiert.

Figur 3 b:

Herstellung von pJM22, eines Vektors zur Oberflächenexpression von Peptiden.

pJM22 produziert das Fusionsprotein FP50, das aus drei Domänen besteht. Am N-terminalen Ende liegt die CtxB-Signalsequenz, die für den Export des entstehenden Fusionsproteins über die Zellmembran (Sec-vermittelt) sorgt. Daran anschließend folgt die Passagierdomäne, in diesem Fall ein Peptid, das Epitop PEYFK. C-terminal endet das Fusionsprotein mit der AIDA- β -Faß/Linker-Region, dem Autotransporter, welcher die N-terminal um das Signalpeptid verkürzte Passagierdomäne auf die Oberfläche von E.coli befördert. Zur Konstruktion von pJM22 wurde zunächst die DNA von pJM7 mit XhoI hydrolysiert und der Vektoranteil von pJM7 durch PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 amplifiziert. Dabei wurde das ctxB-Gen mit Ausnahme seiner Signalsequenz deletiert. Das Oligonukleotid JM20 enthielt in seinem 5'-Überhang zusätzlich zu der KpnI-Schnittsequenz fünf Codons, die für die Aminosäuren PEYFK kodieren. Diese Aminosäurenabfolge stellt ein lineares Epitop für den monoklonalen Antikörper Dül42 dar. Das PCR-Produkt wurde mit KpnI hydrolysiert und anschließend mit sich selbst ligiert.

Figur 4

Expressionsnachweis und Proteasesensitivität.

Aufgrund der starken stabilen Expression der Fusionsproteine FP59 (von pJM7 aus) und FP50 (von pJM22 aus) in E.coli sind diese leicht in einem mit Coomassie Brilliant Blue gefärbten Ganzzelllysatz zu identifizieren. Proteasezugänglichkeit stellt ein übliches Mittel zur Bestimmung der Lokalisierung eines Proteins dar. Zu zelleigenen Proteinen ist nur dann Zugang zu erwarten, wenn diese auf der Außenseite der Bakterie präsentiert werden oder wenn die Außenmembran der Bakterie für Proteasen durchlässig wird. Um letzteres auszuschließen kann man einen Protease-sensitiven Marker benutzen, von dem bekannt ist, daß er natürlicherweise im Periplasma vorliegt. Nur wenn dieser nicht von der eingesetzten Protease angegriffen wird,

- 24 -

ist die Integrität der Außenmembran gewährleistet. Zellen von E.coli UT5600 bzw. JK321 wurden über Nacht auf LB-Agar (50 mg/l Ampicillin) angezogen und in PBS suspendiert. Die Zellsuspensionen wurden auf eine OD578 = 4,0 eingestellt. Zellen von 0,5 ml Zellsuspension wurden 1 min in der Tischzentrifuge sedimentiert und in 200 µl PBS mit 0,1 mg/ml Protease resuspendiert. Die Ansätze wurden 20 min bei 37° C inkubiert und durch Abkühlung auf 0° C, einminütiges Sedimentieren und Resuspendieren des Pellets in 40 µl SDS-PAGE-Probenpuffer und sofortiges fünfzehnminütiges Kochen gestoppt. Die Auswertung erfolgte nach SDS-PAGE durch Western-Blotting (4b und 4c) oder durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue (4a). Um auszuschließen, daß die Proteasen Zugang zum Periplasma hatten, wurden nicht nur Antiseren, die spezifisch für die Passagierproteindomänen sind, eingesetzt sondern auch ein Antiserum spezifisch für den C-terminalen Teil von OmpA, der natürlicherweise unzugänglich im Periplasma vorliegt und deshalb durch extern zugesetzte Proteasen wie Trypsin nicht angreifbar sein sollte (4c).

20

Figur 4a:

SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue zum Nachweis der Proteasesensitivität und zur Quantifizierung der Expression. Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli UT5600.

Spur 1	JK321 pJM7 C *
Spur 2	JK321 pJM7 T**
Spur 3	JK321 pJM7 -***
30 Spur 4	Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und 14 kDa)
Spur 5	JK321 pJM22 C
Spur 6	JK321 pJM22 T
Spur 7	JK321 pJM22 -
35 Spur 8	JK321 pTK61 C
Spur 9	JK321 pTK61 T
Spur 10	JK321 pTK61 -

- 25 -

Spur 11 UT5600 pJM7 C
 Spur 12 UT5600 pJM7 T
 Spur 13 UT5600 pJM7 -
 Spur 14 Molekulargewichtsmarker (94, 67, 43, 30, 20 und
 14 kDa)
 Spur 15 UT5600 pJM22 C
 Spur 16 UT5600 pJM22 T
 Spur 17 UT5600 pJM22 -
 Spur 18 UT5600 pTK61 C
 Spur 19 UT5600 pTK61 T
 Spur 20 UT5600 pTK61 -

C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut

T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut

*** native Zellen

Figur 4 b:

Western-Blot zum Nachweis der Expression und der Proteasesensitivität

Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli
 UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem
 Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemem-
 bran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklö-
 sung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
 und das erste Antiserum, AK55 (Kaninchen-Anti-Choleratoxin B)
 1:200 in Blocklösung verdünnt, zugegeben. Zum Nachweis des
 Epitops PEYFK wurde der Hybridom-Überstand DÜ142 1: 35 ver-
 dünnt in Blocklösung zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit den
 primären Antikörpern inkubiert, anschließend dreimal gewa-
 schen und 30 min mit ProteinA-Alkalische-Phosphatase-Konjugat
 (1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Die Filter wurden mit
 NBT/BCIP-Färbelösung entwickelt.

Spur 1 JK321 pJM7 C *
 Spur 2 JK321 pJM7 T**
 Spur 3 JK321 pJM7 -***
 Spur 4 Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und

- 26 -

18 kDa)

Spur 5	JK321 pJM22 C
Spur 6	JK321 pJM22 T
Spur 7	JK321 pJM22 -
5 Spur 8	JK321 pTK61 C
Spur 9	JK321 pTK61 T
Spur 10	JK321 pTK61 -
Spur 11	UT5600 pJM7 C
Spur 12	UT5600 pJM7 T
10 Spur 13	UT5600 pJM7 -
Spur 14	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18 kDa)
Spur 15	UT5600 pJM22 C
Spur 16	UT5600 pJM22 T
15 Spur 17	UT5600 pJM22 -
Spur 18	UT5600 pTK61 C
Spur 19	UT5600 pTK61 T
Spur 20	UT5600 pTK61 -

20 C* Zellen wurden mit Chymotrypsin verdaut
 T** Zellen wurden mit Trypsin verdaut
 -*** native Zellen

Figur 4 c:

25 Nachweis der Integrität der Außenmembran durch Western-Blot--
 Analyse.

Aufgetragen wurden Ganzzelllysate von E.coli JK321 und E.coli
 UT5600. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine aus dem
 Gel nach dem Semi-dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemem-
 30 bran übertragen. Anschließend wurden die Filter mit Blocklö-
 sung (PBS mit 0,5% Tween 20 und 0,5 M NaCl) 10 min blockiert
 und das erste Antiserum, K56 (Kaninchen Anti-OmpA) 1: 1000 in
 Blocklösung verdünnt, zugegeben. Die Filter wurden 1 h mit
 dem primären Antiserum inkubiert, anschließend dreimal gewa-
 35 schen und 30 min mit Protein A Alkalische-Phosphatase-Konju-
 gat (1: 500 in Blocklösung) inkubiert. Entwickelt wurden die
 Filter mit NBT/BCIP-Färbelösung. OmpA ist ein Außenmembran-

- 27 -

protein von E.coli mit einem C-terminalen periplasmatischen Anteil. Dieser periplasmatische Teil ist Trypsin-sensitiv. Wenn Trypsin Zugang zum Periplasma hat, wird vom reifen OmpA (35 kDa) ein circa 10 - 11 kDa großer Teil abgedaut. Ein Verdau würde also in einer Versetzung der OmpA-Bande im Western-Blot von 35 kDa nach 25 kDa resultieren (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999), was bei Verwendung des AI-DA-I Autotransporters zum Transport rekombinanter Proteine offensichtlich nicht der Fall ist

10

Spur 1	JK321 pTK1 T*
Spur 2	JK321 pJM7 T
Spur 3	JK321 pJM22 T
Spur 4	JK321 pTK61 T
15 Spur 5	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 6	JK321 pTK1 -**
Spur 7	JK321 pJM7 -
Spur 8	JK321 pJM22 -
20 Spur 9	JK321 pTK61 -
Spur 10	leer
Spur 11	UT5600 pTK1 T*
Spur 12	UT5600 pJM7 T
Spur 13	UT5600 pJM22 T
25 Spur 14	UT5600 pTK61 T
Spur 15	Molekulargewichtsmarker (106, 80, 50, 32, 27 und 18kDa)
Spur 16	UT5600 pTK1 -**
Spur 17	UT5600 pJM7 -
30 Spur 18	UT5600 pJM22 -
Spur 19	UT5600 pTK61 -

T* Zellen wurden mit Trypsin verdaut

** native Zellen

35

Figur 5

Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz ganzer, nicht permeabilisierter Zellen stellt eine übliche Methode des Nachweises auf der Zelloberfläche exponierter Determinanten dar. Die dabei zur Detektion der Determinanten eingesetzten Antikörper sind zu groß, um durch die intakte Außenmembran zu gelangen. Zur Unterscheidung und zur Abschätzung der Hintergrundaktivität von periplasmatisch oder zellulär exprimierten Determinanten benutzt man als Kontrolle Antikörper gegen bekanntermaßen periplasmatisch bzw. zellulär exprimierte Antigene.

10

Zellen von E.coli UT5600, die eines der Plasmide pBA, pTK1, pTK61, pJM7 oder pJM22 enthielten, wurden über Nacht auf LB-Agar (Ampicillin 50 mg/l) angezogen und in PBS bis zu einer optischen Dichte von 0,1 bei 578 nm suspendiert. Mit 500 μ l dieser Zellsuspension wurden Deckgläser, die in 24 Loch-Mikrotiterplatten lagen, überschichtet. Die Zellen wurden 5 min in der Plattenzentrifuge auf die Deckgläser sedimentiert. 450 μ l des Überstands wurden abgehoben und durch PBS mit 2,5% PFA (Paraformaldehyd) ersetzt, womit 20 min lang fixiert wurde. Der Überstand wurde gänzlich abgehoben und es wurde dreimal mit 500 μ l PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 5 min Inkubation mit 300 μ l PBS, das 1% FCS enthielt, blockiert. Die Blockierungslösung wurde restlos abgehoben, die Deckgläser in ihren Vertiefungen zentriert, mit 15 μ l einer 1:100 Verdünnung des Kaninchenserums AK55 (gegen Choleratoxin B entwickelt) bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 500 μ l PBS gewaschen, 5 min mit 350 μ l PBS/FCS blockiert und mit 15 μ l einer 1: 100 Verdünnung eines Ziege--Anti-Kaninchen-Texasrot-Konjugats 30 min inkubiert. Nach folgendem dreimaligem Waschen wurden die Deckgläser auf Objektträger gelegt und mit Einbettungsmedium eingebettet. Das Ergebnis der Immunfluoreszenz wurde mikroskopisch beurteilt und bei gleichlangen Belichtungszeiten photographisch festgehalten.

35

a) E.coli UT5600 pBA (als Negativkontrolle benutzter Stamm, der nur den Klonierungsvektor ohne Insert enthält)

- 29 -

- b) E.coli UT5600 pTK1 (produziert das Cholera-toxin B, das ins Periplasma exportiert wird. Dieses Konstrukt dient zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des periplasmatisch exprimierten Cholera-toxin B).
- 5 c) E.coli UT5600 pJM7 (exprimiert FP59, das Fusionsprotein aus AIDA und Cholera-toxin B, welches auf der Oberfläche von E.coli präsentiert wird).
- d) E.coli UT5600 pJM22 (exprimiert FP50, das Fusionsprotein aus AIDA und dem Epitop PEYFK. Mit diesem Konstrukt wird
10 demonstriert, daß der AIDA-Anteil der FP59 und FP50 keine Kreuzreaktivität mit dem in diesem Experiment benutzten AK55 aufweist).
- e) E.coli UT5600 pTK61 (produziert ein Fusionsprotein aus Cholera-toxin B und Iga- β , das auf der Oberfläche von
15 E.coli präsentiert wird (Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991- 1999). Dient dem Vergleich mit dem AIDA--Konstrukt FP59).

Figur 6

20 DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide

Figuren 7-24

DNA-Sequenz (nicht-kodierender Strang) und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen von bakteriellen Autotransportern.

25

Figur 7

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von AIDA-I aus Escherichia coli (Benz und Schmidt, Mol.Microbiol. 6 (1992), 1539-1546).

30

Figur 8

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Autotransporters von BrkA aus Bordetella pertussis (Fernandez und Weiss, Infect Immun. 62 (1994), 4727-4738).

35

Figur 9

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

- 30 -

transporters von Hap aus *Haemophilus influenzae* (StGeme et al., Mol.Microbiol. 14 (1994), 217-233).

Figur 10

- 5 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Hsr aus *Helicobacter mustelae* (O'Toole et al., Mol.Microbiol 11 (1994), 349-361).

Figur 11

- 10 Darstellungen des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von IcsA aus *Shigella flexneri* (Goldberg et al., J.Bacteriol 175 (1993), 2189-2196).

Figur 12

- 15 Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (outer membrane protein P96) aus *Bordetella pertussis* (Charles et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 86 (1989), 3554-3558).

20 Figur 13

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Prn (P70, Pertactin) aus *Bordetella parapertussis* (Li et al., J.Gen.Microbiol. 138 (1992), 1697-1705).

25 Figur 14

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von dem 190 kDa cell surface antigen aus *Rickettsia rickettsii* (Anderson et al., unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. M31227).

30

Figur 15

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SpaP aus *Rickettsia prowazekii* (Carl et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87 (1990), 8237-8241).

35

Figur 16

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-

transporters aus dem 120 kilodalton outer membrane protein (rOmp B) von *Rickettsia rickettsii* (Gilmore et al., Mol.Microbiol. 5 (1991), 2361-2370).

5 Figur 17

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SlpT aus *Rickettsia typhi* (Hahn et al., Gene 133 (1993), 129-133).

10 Figur 18

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von SepA aus *Shigella flexneri* (Benjellou-Touimi et al., Mol.Microbiol. 17 (1995), 123-135).

15 Figur 19

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp aus *Serratia marcescens* RH1 (Rho, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. X59719).

20 Figur 20

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp von *S.marcescens* IFO-3046, clone pSP11 (Yanagida et al., J.Bacteriol. 166 (1986), 937-944).

25 Figur 21

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h1 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-Accessionnr. D78380).

30

Figur 12

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Ssp-h2 aus *Serratia marcescens*, strain IFO3046 (Onishi und Horinouchi, unveröffentlicht, Genbank-

35 Accessionnr. D78380).

Figur 23

- 32 -

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von Tsh aus *Escherichia coli* (Provence et al. 1994, *Infect.Immun.* 62 (1994), 1369-1380).

5 Figur 24

Darstellung des in die Membran integrierten Teils des Auto-transporters von VacA aus *Helicobacter pylori* (Schmitt und Haas, *Mol.Microbiol.* 12 (1994), 307-319). Von VacA sind noch mindestens 3 weitere Formen bei *Helicobacter pylori* bekannt,
10 die sich aber in dem angegebenen Bereich nicht wesentlich unterscheiden.

BEISPIELE

Beispiel 1:

5

Identifizierung und Lokalisierung des Autotransporters in einem Oberflächenprotein von *Escherichia coli*.

Um einen für die gewünschte Anwendung adäquaten Autotransporter, d.h. angepaßt an das Passagierprotein und den zu verwendenden Wirtsstamm, zu finden, ist es notwendig eine Analyse der C-terminalen Aminosäuresequenz eines in Frage kommenden Proteins durchzuführen. Dabei kann es sich um ein bereits als Oberflächenfaktor identifiziertes Protein handeln, aber auch
15 um eine in einer Datenbank abgelegte Aminosäuresequenz eines Proteins mit unbekannter Funktion, um eine von einer in einer Datenbank abgelegten DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins oder die im Anschluß an eine Sequenzanalyse von einem Gen abgeleitete Aminosäuresequenz eines Proteins. Der N-Terminus des Proteins sollte eine Signalpeptidsequenz enthalten um einen Transport über die innere Membran zu ermöglichen und am C-Terminus sollte der in die Membran intergrierte Teil mit der aromatischen Aminosäure Phenylalanin oder Tryptophan beginnen, gefolgt von abwechselnd polaren
25 (oder geladenen) und hydrophoben (oder aromatischen) Aminosäuren. Die Passagierdomäne sollte wenig Cysteine und überhaupt keine Disulfidbrücken enthalten, da sich gezeigt hat, daß diese einen Transport des Passagiers durch die gebildete Pore blockiert. Der Hydrophobizitätsplot sollte eine gerade
30 Anzahl von amphipatischen β -Faltblattstrukturen anzeigen, aus denen sich die Außenmembranpore konstituiert. Die amphipatischen β -Faltblattstrukturen sollten ca. 12 Aminosäuren lang sein und ein Minimum an geladenen Aminosäuren zur Membranseite hin orientiert enthalten, wobei die die Membrandurchgänge verbindenden Schleifen zum Periplasma hin wenige Aminosäuren enthalten. Zur Außenseite (Medium) hin können
35 erheblich mehr Aminosäuren vorliegen. Daraus ergeben sich im

Hydrophobizitätsplot eine Zusammenlagerung der Membran-
durchgänge in antiparallelen Paaren mit Ausnahme des ersten
und des letzten Membrandurchgangs, die durch antiparallele
Zusammenlagerung miteinander die Faßstruktur der Pore voll-
enden. Ausgehend von der Erfüllung dieser Kriterien läßt sich
nun ein Modell des Autotransporters aufstellen, mit Hilfe
dessen die Lage und Ausdehnung der für den Transport notwen-
digen Aminosäuren festgelegt werden kann. Zusätzlich zu den
für die Pore notwendigen Aminosäuren muß für einen funktions-
fähigen Autotransporter auch noch eine sogenannte Linkerre-
gion, die vom periplasmatisch gelegenen N-Terminus der β -Faß-
struktur durch die Pore an die Oberfläche verläuft, in das
Fusionsprotein mitübernommen werden, damit die Oberflächen-
exposition aller Passagierdomänen vollständig gewährleistet
ist.

Erstes Ziel der vorliegenden Erfindung war es ein System zur
optimierten Oberflächenexposition rekombinanter Proteine in
E.coli bereitzustellen. Deshalb wurde nach einem Autotrans-
porter in einem natürlichen Oberflächenprotein von E.coli
gesucht. Die Wahl fiel auf das Adhesin AIDA-I (Adhesin Invol-
ved in Diffuse Adherence, Benz und Schmidt Infect. Immun. 57
(1989) 1506-1511), dessen Sequenz in Datenbanken verfügbar
war. Erfindungsgemäß zeigte sich eine Signalsequenz am N-Ter-
minus von 49 Aminosäuren, während am C-Terminus die erfin-
dungsgemäßen Vorgaben durch die Aminosäurenabfolge FSYKI (Phe-
nylalanin-Serin-Tyrosin-Lysin-Isoleucin) erfüllt waren. Die
transportierte Domäne enthielt keine Cysteine und durch den
Hydrophobizitätsplot (Figur 1) wurden 14 antiparallele, amp-
hipatische β - Faltblattstrukturen vorhergesagt. Somit sind
für die Bildung der Pore mindestens die Aminosäuren von Alanin
an Position 1014 der gesamten Aminosäuresequenz (Benz und
Schmidt, Mol. Microbiol. 6 (1992) 1539-1546) bis zu Phenyla-
lanin an Position 1286 notwendig (Figur 2). Als Linkerregion
wurden zusätzlich Aminosäuren, die sich N-terminal an das
Alanin 1014 anschließen ausgewählt. Die somit ausgewählte
funktionelle Autotransporterregion konnte nun mittels PCR aus

der DNA des entsprechenden E.coli EPEC2787 isoliert werden und zur Konstruktion eines Fusionsproteins verwendet werden.

Beispiel 2:

- 5 Konstruktion eines oberflächenexponierten Fusionsproteins mit einer antigenen Determinante als Passagierprotein

Ausgehend von den Annahmen, daß es sich bei AIDA-I um einen Autotransporter handelt und daß eine Genfusion aus einem be-
10 liebigen Passagier und einem E.coli-eigenen Autotransporter (nämlich AIDA- β) für E.coli besser verträglich sein sollte als eine Genfusion desselben Passagiers mit einem heterologen Autotransporter (z.B. Iga- β) wurde eine Genfusion zwischen aida- β und einem Gen für ein Passagierprotein vorgenommen. Um
15 den Transport des Passagiers zu gewährleisten, wurde nicht nur AIDA- β sondern auch eine N-terminal vom β -Faß gelegene Verbindungsregion ("Linker") kloniert.

Als Passagier wurde CtxB ausgewählt und das entsprechende Gen
20 aus pTK1 (Klauser et al, EMBO J. 9 (1990), 1991-1999) mit den Oligonukleotiden EF16 und JM6 mittels PCR amplifiziert. Da AIDA-I Plasmid-kodiert in E.coli EPEC 2787 (Benz und Schmidt, Infect. Immun. 57 (1989), 1506-1511) vorliegt, wurde der AIDA-I Autotransporter mit Linkerregion ebenfalls durch PCR mit
25 den Oligonukleotiden JM1 und JM7 aus einer Plasmidpräparation von E.coli EPEC 2787 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen verdaut, deren Erkennungssequenzen in den Oligonukleotiden enthalten waren. Die beiden so entstandenen Fragmente wurden in einen passend vorverdau-
30 ten Klonierungsvektor (pBA) mit hoher Kopienzahl kloniert. So entstand ein Konstrukt mit einem künstlichen konstitutiven Promotor (PTK; Klauser et al., EMBO J. 9 (1990) 1991-1999) vor einer Genfusion bestehend aus ctxB am 5'-Ende (kodierend für die Aminosäuren 1-113), gefolgt von einem AIDA-I Linker
35 (kodierend für die Aminosäuren 116-279 des Fusionsproteines) und dem AIDA-I Autotransporter (kodierend für die Aminosäuren 280-563 des Fusionsproteines) am 3'-Ende (Figur 3a). Die ent-

standene Genfusion wurde FP59 benannt.

Die verglichen mit dem bisher existierenden System Iga- β substantiell stärkere Expression, die ohne die bei Iga- β zu beobachtende Neigung zur Lyse erzielt wurde, konnte eindeutig durch vergleichende Elektrophorese von Ganzzell-Lysaten (Figur 4a) demonstriert werden.

Der Nachweis der Oberflächenexposition von FP59 wurde durch verschiedene Methoden geführt. Die Proteasesensitivität von FP59 zeigte sich im Protein-Gel durch eine Verringerung des Molekulargewichts im Anschluß an einen Zusatz von Trypsin oder Chymotrypsin (Figur 3a). Es entstanden Protease-resistente Fragmente mit jeweils circa 33-35 kDa Masse (Figur 3a). Diese Protease-resistenten Fragmente enthalten keine immunogenen Anteile des Passagierproteins. Dies konnte durch Western-Blot-Analyse von Ganzzell-Lysaten unter Verwendung eines Anti-Choleratoxin B Serums im Vergleich von Protease-verdauten und unverdauten FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Figur 4b und Vergleich von 4a und 4b).

Durch N-terminale Ansequenzierung der membrangeschützten Trypsinverdauungsprodukte wurde gefunden, daß die Membranlinkerregion beim AIDA-Autotransporter eine Länge von 55 Aminosäuren besitzt.

Mit den Proteaseverdauungen konnte auch die Integrität der Außenmembran von FP59-exprimierenden E.coli gezeigt werden (Abb. 4c). Dazu wurden Ganzzell-Lysate im Anschluß an den Verdau mit Trypsin durch Immunoblot mit einem Anti-OmpA-Serum entwickelt. Sowohl unverdaute Zellen als auch trypsinverdaute Zellen zeigten ein intaktes OmpA, wie es für Zellen mit einer intakten Außenmembran zu erwarten war.

Auch mit Immunfluoreszenzstudien ließ sich die Oberflächenexposition und starke Expression von FP59 zeigen (Figur 5). Durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern läßt sich

die Oberflächenexposition eines Antigens auf einer Bakterienzelle bei intakter Außenmembran nachweisen. Dies zeigten FP59 exprimierende E.coli-Zellen durch starke Fluoreszenz an. Die als Negativkontrollen verwendeten E.coli Zellen mit periplasmatisch exprimiertem Cholera-toxin B, mit oberflächenexponiertem FP50 (Figur 3b) und mit nichtrekombinantem Klonierungsvektor waren eindeutig negativ. Das periplasmatische Cholera-toxin B demonstrierte die Unzugänglichkeit des Periplasmas für Antikörper (Figur 5b), durch das negative Resultat der Immunfluoreszenz mit FP50 konnte eine Kreuzreaktivität des verwendeten Antiserums (gegen das Passagierprotein) mit den AIDA-Anteilen von FP59 ausgeschlossen werden (Figur 5d). Die Immunfluoreszenz mit dem nichtrekombinanten Klonierungsvektor war ein Maß für die der Meßmethode innewohnende Hintergrundfärbung (Figur 5a). Außerdem war somit ein Vergleich der Expression von FP59 mit B61, dem von pTK61 produzierten, oberflächenpräsentierten Cholera-toxin B-Iga- β -Fusionsprotein möglich (Figuren 5c und 5e), wobei ebenfalls ein eindeutiger Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Systems nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 3:

Konstruktion einer oberflächenpräsentierten Peptidfusion

Ein Peptid, das als lineares Epitop für einen monoklonalen Antikörper (Dül42) fungiert, wurde auf der Oberfläche präsentiert und nachgewiesen. Zur Klonierung des Peptids wurde eine PCR-abhängige Strategie benutzt, die für die Generierung und Oberflächenexposition von Peptidbibliotheken äußerst geeignet ist. Dabei wird eine dreifache Genfusion aus dem Exportsignal von ctxB (Basen 1- 81), einer für ein Peptid kodierenden kurzen Sequenz (Basen 82-96) und der aida-linker/aida- β -Region (Basen 103-1450) gebildet.

pJM7 (Figur 3a) wurde mit XhoI linearisiert und als Matrize für eine PCR mit den Oligonukleotiden JM7 und JM20 (Figur 6)

benutzt (Figur 3b). Beide Oligonukleotide wiesen an ihren 5'-Enden eine KpnI-Erkennungssequenz auf. JM7 wurde so gewählt, daß bei seiner Verwendung in einer PCR die aida-linker/aida- β -Domänen amplifiziert wurden. JM20 wurde so gewählt, daß im PCR-Produkt die in ctxB enthaltene Signalsequenz für den Sec-abhängigen Membrantransport über die Cytoplasmamembran und die sechs daran anschließenden Codons mit enthalten waren. Außerdem enthielt JM20 in seiner 5'-ständigen, nicht zur Matrize komplementären Verlängerung, fünf Codons, die für das lineare Epitop des Antikörpers D μ 142 kodierten. Stromaufwärts dieser Codons lag die KpnI-Erkennungssequenz. Nach der PCR wurde das resultierende Produkt mit KpnI hydrolysiert, mit sich selbst ligiert und anschließend in E.coli transformiert. Die Identifizierung korrekter Genfusionen wurde mittels Kolonie-Immunoblot vorgenommen (ohne Figur). Der Nachweis der Expression und der Oberflächenexposition wurde in Analogie zu den in Beispiel 2 beschriebenen Methoden durch Western-Blot-Analyse von Proteaseverdauungen und Analyse von Proteinfärbungen im Gel (Figuren 4a,b,c) geführt.

Die Generierung umfassender Peptidbibliotheken ist durch eine geringfügige Änderung der hier beschriebenen Klonierungsstrategie machbar. Die für JM20 beschriebene Aufteilung der verschiedenen funktionellen Bereiche dieses Oligonukleotids muß dazu so geändert werden, daß der für das lineare Epitop kodierende Bereich durch einen Bereich ersetzt wird, der bei der Oligonukleotidsynthese gewollt der Degeneration unterworfen wird. Degeneration heißt, daß anstatt definierter Basen an allen Position dieses funktionellen Bereichs einzelne, mehrere, oder alle Basen durch ein Basengemisch aus bis zu vier verschiedenen Basen ersetzt werden. Dadurch kann jedes Codon anstatt für eine Aminosäure für bis zu 20 verschiedene Aminosäuren kodieren, wodurch ein Pool von kodierenden Sequenzen entsteht, die für alle denkbaren Kombinationen von Aminosäuren in einem Peptid der vorgegebenen Länge theoretisch möglich sind. Die Zelle, die das Peptid mit der ge-

- 39 -

wünschten Eigenschaft trägt kann nun vermittelt durch Bindung des oberflächenexponierten Peptids an einen Bindungspartner, der beispielsweise an eine Matrix immobilisiert vorliegt, Fluoreszenz-markiert ist oder an Magnetkugeln gekoppelt ist, isoliert werden und zur beständigen Produktion und Charakterisierung verwendet werden.

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur Präsentation von Peptiden oder/und Poly-
5 peptiden auf der Oberfläche von Gram-negativen Wirtsbak-
terien,
wobei man,
- (a) ein Wirtsbakterium bereitstellt, das transformiert
mit einem Vektor, auf dem in operativer Verknüpfung
10 mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäure-
sequenz lokalisiert ist, umfassend:
- (i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäure-
abschnitt,
- (ii) einen für das zu präsentierende Passagierpep-
15 tid oder/und Passagierpolypeptid kodierenden
Nukleinsäureabschnitt,
- (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerken-
nungsstelle kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt,
- 20 (iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden
Nukleinsäureabschnitt und
- (v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-
transporters kodierenden Nukleinsäureab-
schnitt; und
- 25 (b) das Wirtsbakterium unter Bedingungen kultiviert,
bei denen eine Expression der fusionierten Nuklein-
säuresequenz und eine Präsentation des von dem Nu-
kleinsäureabschnitt (ii) kodierten Peptids oder
Polypeptids an der Oberfläche des Wirtsbakteriums
30 erfolgt,
- dadurch gekennzeichnet,**
daß der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für die
Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
heterolog und das Wirtsbakterium gegenüber dem für die
35 Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt
homolog ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der verwendete Autotransporter aus einer Gattung der
Enterobacteriaceae abgeleitet wurde und in einem Wirts-
bakterium einer Gattung der Enterobacteriaceae verwendet
wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Aida-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des SepA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des IcsA-Proteins aus Shi-
gella flexneri oder eine Variante davon verwendet.
6. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Tsh-Proteins aus
E.coli oder eine Variante davon verwendet.
7. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Ssp-Proteins aus Ser-
ratin marcescens oder eine Variante davon verwendet.
8. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transporterdomäne des Hsr-Proteins aus Hel-
icobacter mustelae, des Prn-Proteins aus Bordetella
ssp., des Hap-Proteins aus Haemophilus influenzae, des

BrkA-Proteins aus Bordetella pertussis, des VacA-Proteins aus Helicobacter pylori oder eines der Rickettsienproteine 190kDa Zelloberflächenprotein, SpaP, rOmpB oder SlpT, verwendet.

5

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere Peptide, insbesondere Peptide mit einer Länge von 4-50 Aminosäuren präsentiert werden.

10

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere eukaryontische Polypeptide präsentiert werden.

15

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um einen Antikörper oder eine Antigen bindende Domäne eines Antikörpers handelt, wobei Antigen bindende Domäne mindestens den Bereich eines Antikörpermoleküls bezeichnet, der hinreichend ist für die spezifische Bindung eines Antigens.

20

- 25 12. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die α -Kette eines MHC Klasse II Moleküls handelt.

- 30 13. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette eines MHC-Klasse II Moleküls handelt.

- 35 14. Verfahren nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Passagierpolypeptid um die β -Kette

eines MHC Klasse II Moleküls handelt, an dem N-terminal Aminosäuren angehängt vorliegen, die sich als Peptid in die Bindungsgrube des funktionellen MHC Moleküls einlagern können.

5

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14,

dadurch gekennzeichnet,

daß Bibliotheken von varianten Passagierpeptiden oder -polypeptiden erzeugt, in Wirtszellen exprimiert und an der Oberfläche präsentiert werden.

10

16. Verfahren nach Anspruch 15,

dadurch gekennzeichnet,

daß die varianten Passagierpeptide oder -polypeptide in einem konstanten Kontext eines Passagierpolypeptids präsentiert werden.

15

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 16,

dadurch gekennzeichnet,

daß eine Wirtsbakterienzelle unterschiedliche Passagierpeptide oder -polypeptide jeweils in Verbindung mit einer Transporterdomäne präsentiert.

20

18. Verfahren nach Anspruch 17,

dadurch gekennzeichnet,

daß unterschiedliche Transporterdomänen in Verbindung mit unterschiedlichen Passagierpeptiden oder -polypeptiden verwendet werden.

25

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 - 18, weiterhin umfassend den Schritt des Selektionierens einzelner Passagierpeptide oder -polypeptide aus einer Bibliothek von varianten Peptiden oder Polypeptiden.

30

20. Verfahren zur Herstellung einer varianten Population von oberflächenexponierten Peptiden oder Polypeptiden und zur Identifizierung der Bakterien, die Peptide bzw. Po-

35

- 44 -

lypeptide mit einer jeweils gewünschten Eigenschaft tragen, wobei das Verfahren folgende Schritte umfaßt:

- 5 (1) Herstellen eines oder mehrerer Fusionsgene durch Klonierung der kodierenden Sequenz eines gewünschten Passagiers in frame mit der kodierenden Sequenz der Transporterdomäne eines Autotransporters und eines Signalpeptides in mindestens einen Vektor;
- 10 (2) Variieren des Passagierpeptids bzw. -polypeptids durch Mutagenese;
- 15 (3) Einbringen des Vektors oder der Vektoren in Wirtsbakterien, die den Passagier oder die Passagiere stabil an der Oberfläche präsentieren können,
- (4) Exprimieren des Fusionsgens bzw. der Fusionsgene in den Wirtsbakterien;
- 20 (5) Kultivieren der Bakterien zur Produktion des stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiers oder der stabil oberflächenexponiert präsentierten Passagiere;
- 25 (6) gegebenenfalls Selektionieren der Bakterien, die den Passagier oder die Passagiere mit den gewünschten Eigenschaften auf der Oberfläche tragen, und
- 30 (7) gegebenenfalls Charakterisieren eines Bindungspartners für den Passagier mit den optimalen Eigenschaften.
21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei einzelne Schritte des Verfahrens weggelassen werden können.
- 35 22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Verfahren mehrmals durchlaufen wird.

23. Verfahren nach Anspruch 20, wobei man die Transporterdomäne AIDA-I oder eine Variante davon verwendet.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 23, wobei das im Fusionsprotein enthaltene Passagierprotein ein Peptid oder Polypeptid mit einer Affinität zu einem Bindungspartner, ein Ligand, ein Rezeptor, ein Antigen, ein Toxin-bindendes Protein, ein Protein mit enzymatischer Aktivität, ein Nukleinsäure-bindendes Protein, ein Inhibitor, ein Chelator-Eigenschaften habendes Protein, ein Antikörper oder eine Antigen-bindende Domäne eines Antikörpers ist.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 - 24, wobei die Identifizierung des Bakteriums, das einen Passagier mit einer gewünschten Bindungsaffinität oberflächenexponiert präsentiert, durch Bindung an einen immobilisierten oder/und markierten Bindungspartner erfolgt.
26. Verfahren nach Anspruch 20, wobei der Bindungspartner so modifiziert ist, daß er in einem zweiten Schritt durch einen für die Modifikation spezifischen Bindungspartner detektiert werden kann.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß Passagierproteine oder Teile davon auf der Bakterienoberfläche chemisch oder enzymatisch modifiziert werden.
28. Verfahren nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Modifikation eine nicht-kovalente Modifikation ist.
29. Verfahren nach Anspruch 27, **dadurch gekennzeichnet**,

daß die Modifikation eine kovalente Modifikation ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

5 daß die Modifikation eine Glykosylierung ist.

31. Verfahren nach Anspruch 29,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Phosphorylierung ist.

10

32. Verfahren nach Anspruch 27,

dadurch gekennzeichnet,

daß die Modifikation eine Proteolyse ist.

15

33. Verfahren nach Anspruch 32,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch intrinsische oder extern zugeführte Proteasen selektiv von der Bakterienoberfläche freigesetzt werden.

20

34. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine intrinsische Protease der Wirtszelle, insbesondere die OmpT-Protease, die OmpK-Protease oder die Protease X, freigesetzt werden.

25

35. Verfahren nach Anspruch 33,

dadurch gekennzeichnet,

30

daß Passagierproteine oder Teile davon durch eine extern zugeführte Protease, insbesondere die IgA-Protease, Thrombin oder Faktor X, freigesetzt werden.

36. Rekombinanter Vektor auf dem in operativer Verknüpfung

35

mit einem Promotor eine fusionierte Nukleinsäuresequenz lokalisiert ist, umfassend:

(i) einen Signalpeptid-kodierenden Nukleinsäureab-

- 47 -

schnitt,

(ii) einen für das zu präsentierende Passagierpeptid
oder/und Passagierpolypeptid kodierenden Nukleinsäureabschnitt,

5 (iii) gegebenenfalls einen für eine Proteaseerkennungs-
stelle kodierenden Nukleinsäureabschnitt,

(iv) einen für einen Transmembranlinker kodierenden Nukleinsäureabschnitt und

10 (v) einen für eine Transporterdomäne eines Auto-
transporters kodierenden Nukleinsäureabschnitt;

wobei der Nukleinsäureabschnitt (ii) gegenüber dem für
die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt heterolog ist.

15

37. Rekombinantes Gram-negatives Wirtsbakterium,
dadurch gekennzeichnet,
daß es mit einem Vektor nach Anspruch 36 transformiert
ist.

20

38. Wirtsbakterium nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß es gegenüber dem für die Transporterdomäne (v) kodierenden Nukleinsäureabschnitt homolog ist.

25

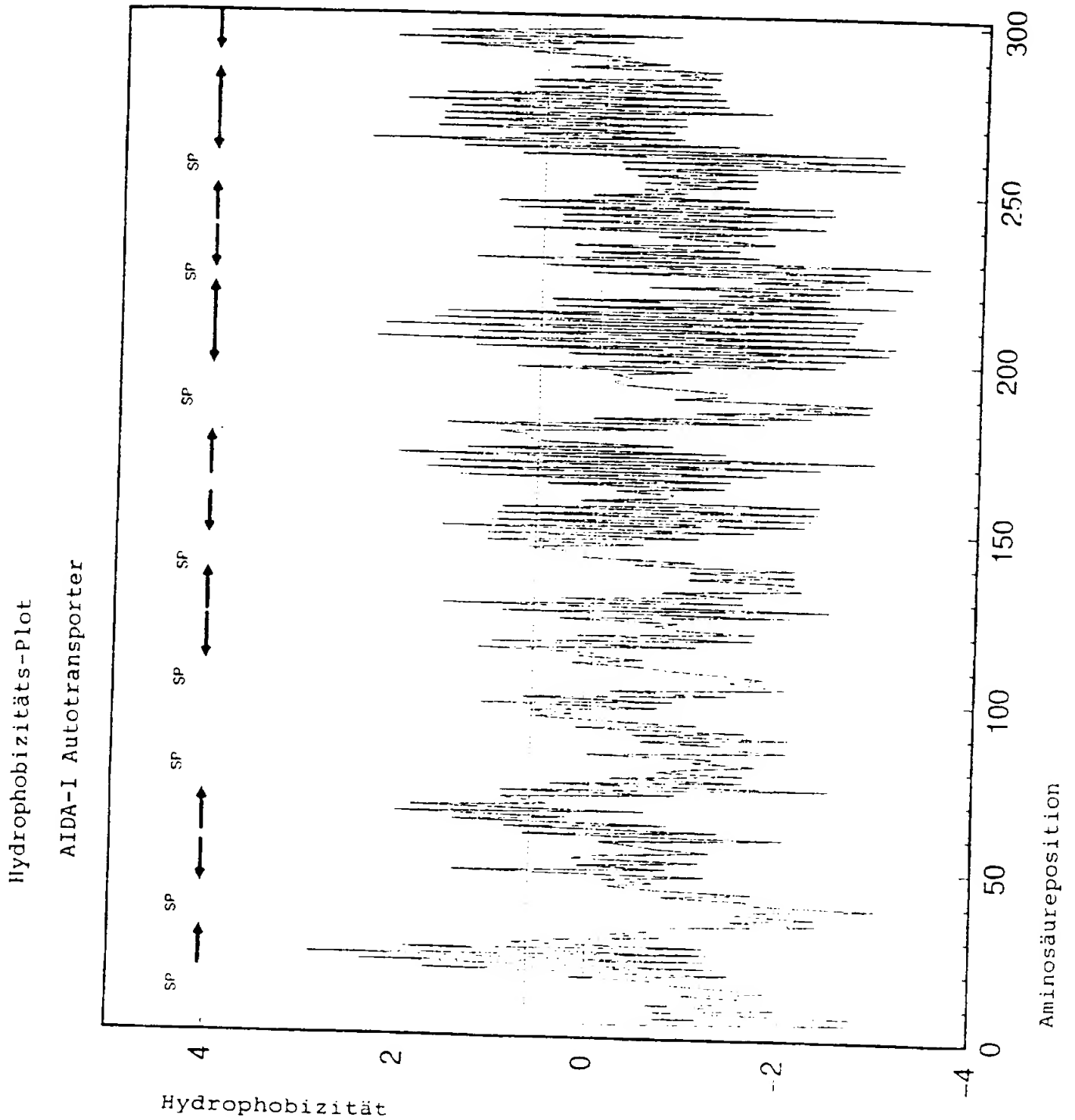
39. Wirtsbakterium nach Anspruch 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß es eine E.coli Zelle ist.

30 40. Wirtsbakterium nach einem der Ansprüche 37 - 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nukleinsäureabschnitt (v) für die Transporterdomäne des AIDA-Proteins oder eine Variante davon kodiert.

35

1/20

Fig. 1



2/28

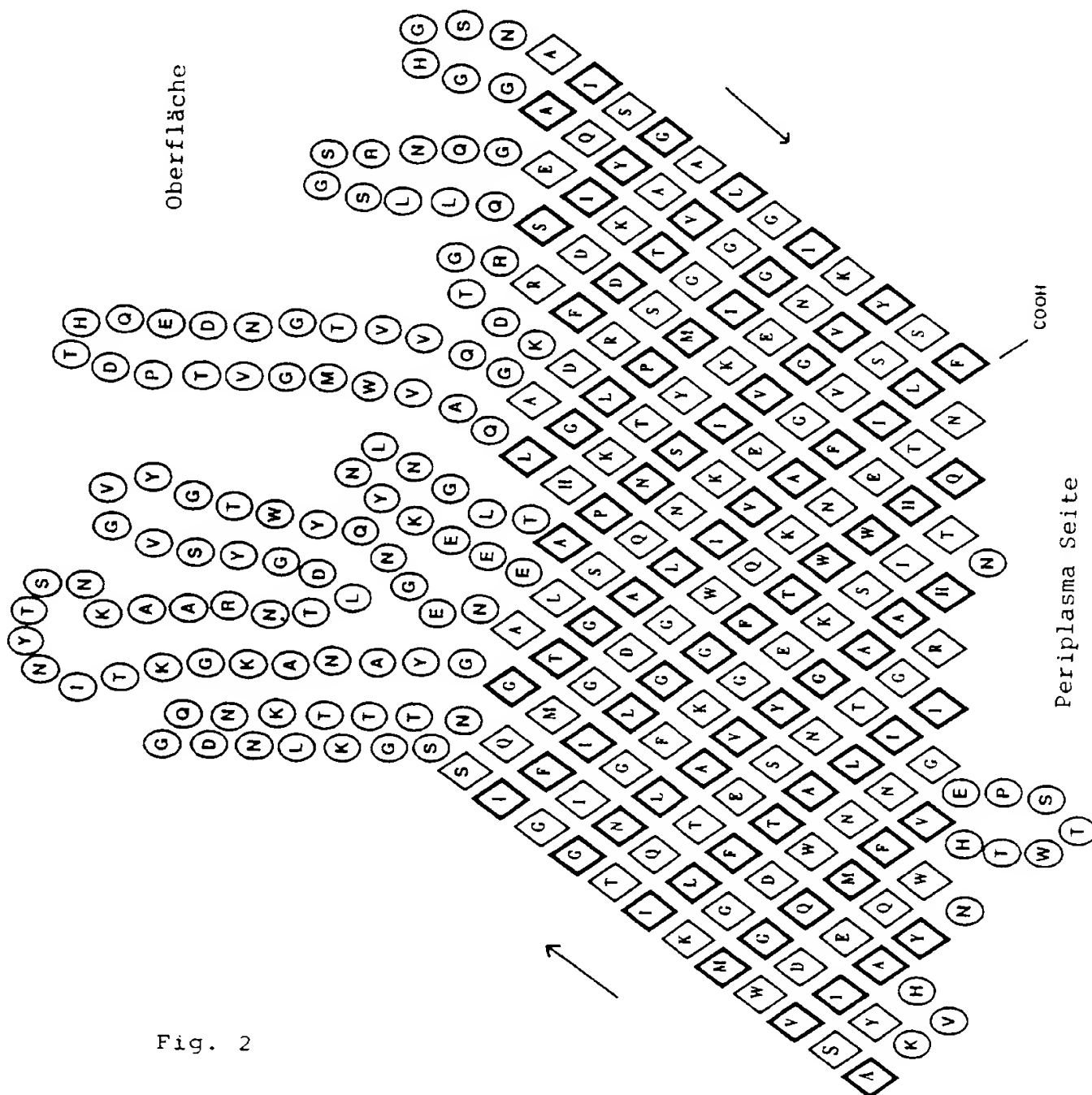


Fig. 2

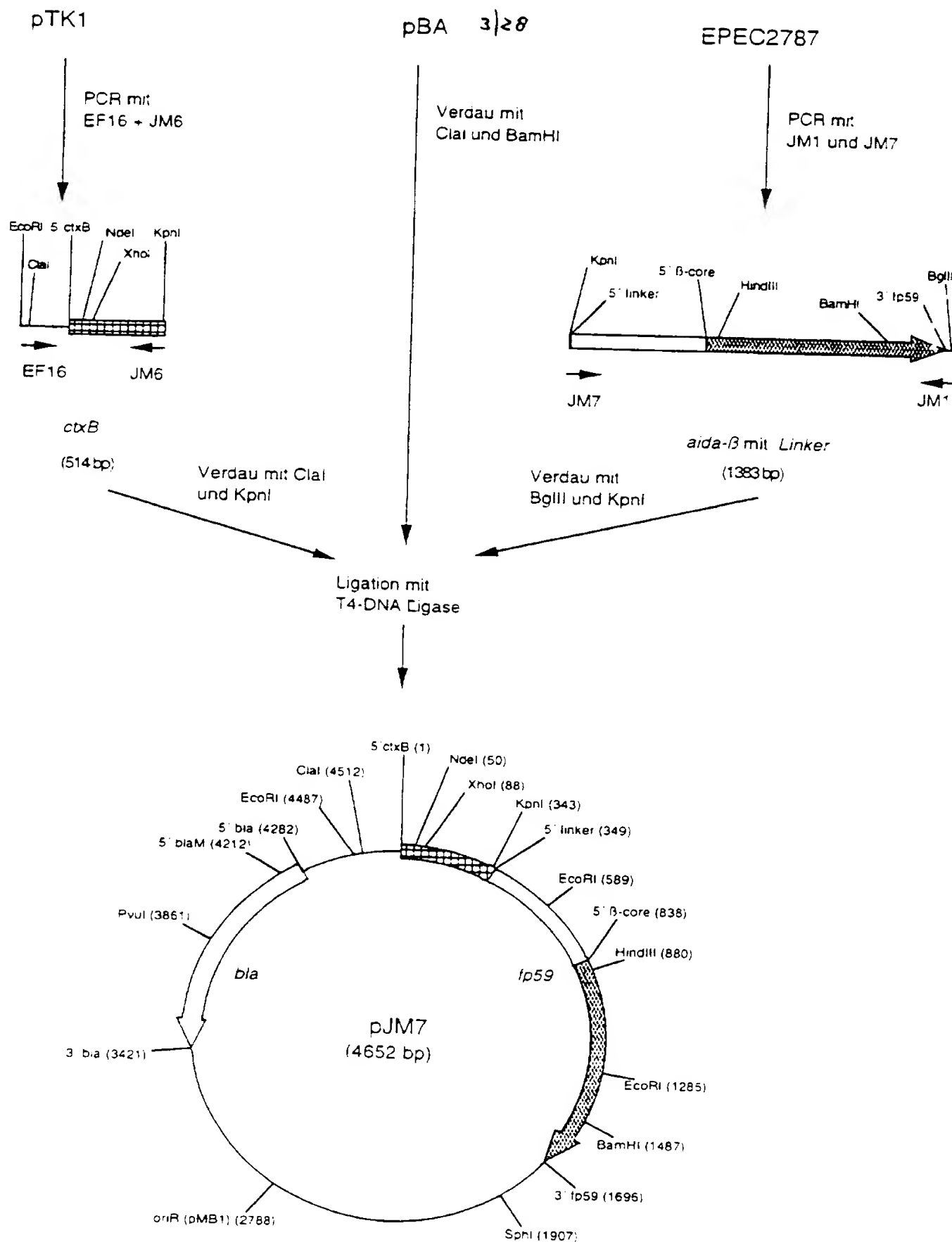


Fig. 3a

ERSATZBLATT (REGEL 26)

pJM7 4/28

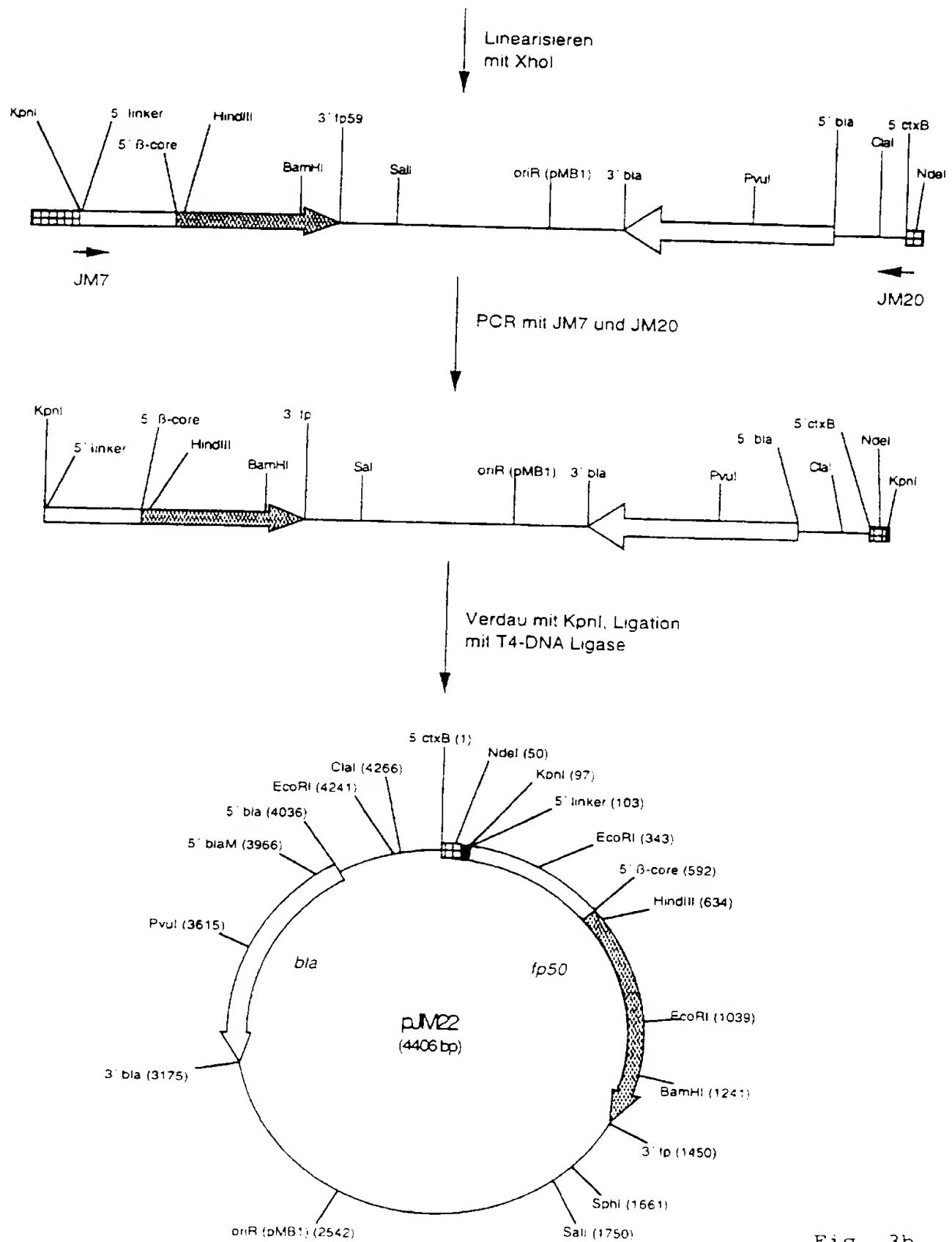
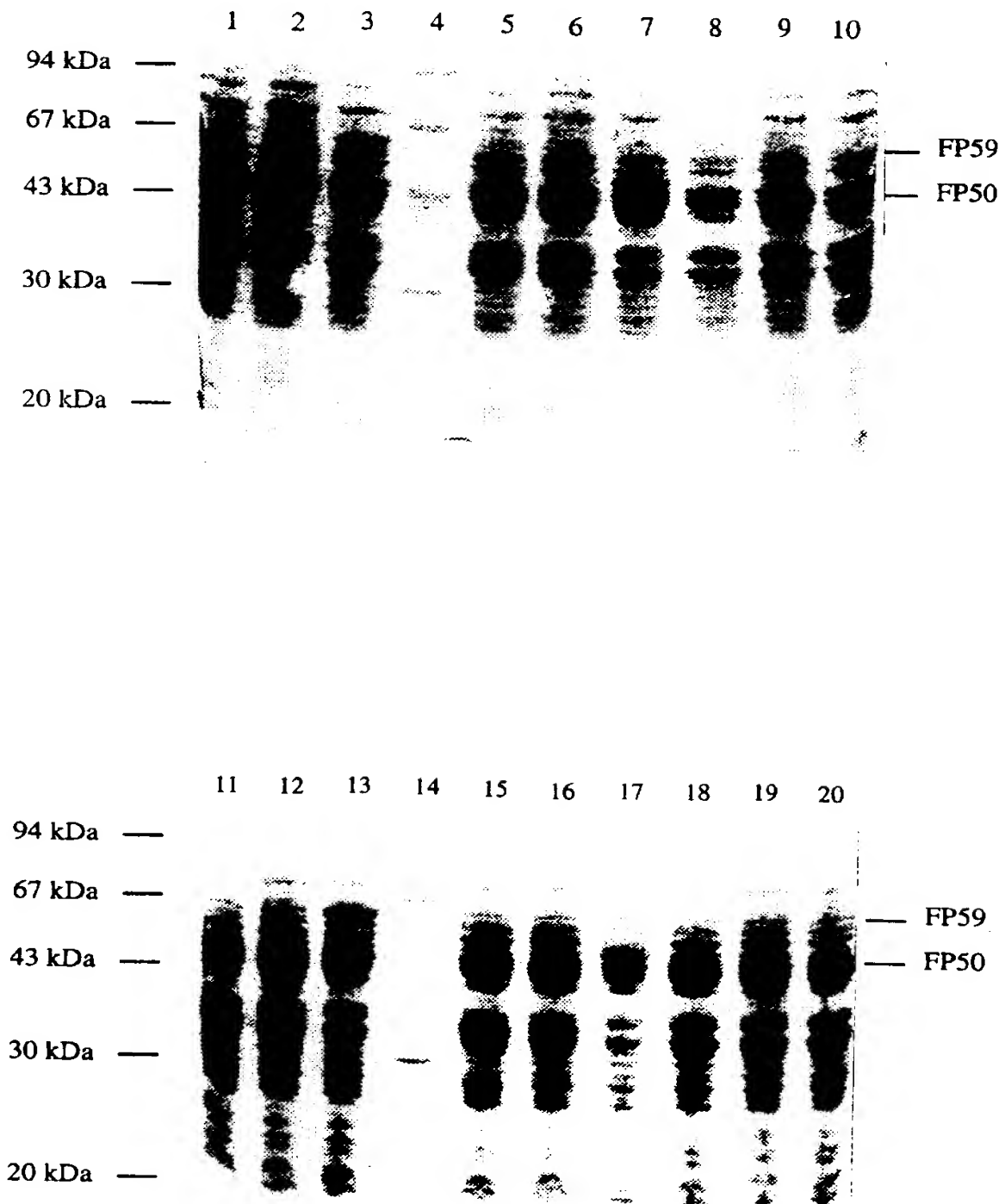


Fig. 3b

ERSATZBLATT (REGEL 26)

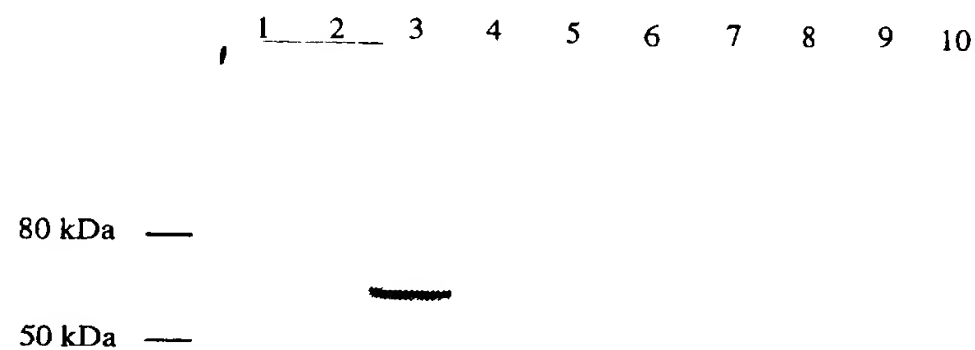
Figur 4a)

5/28



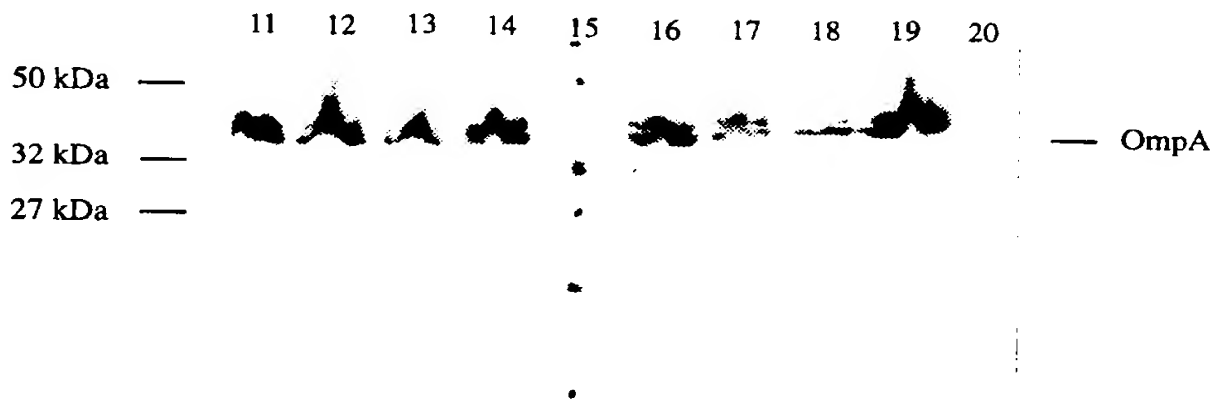
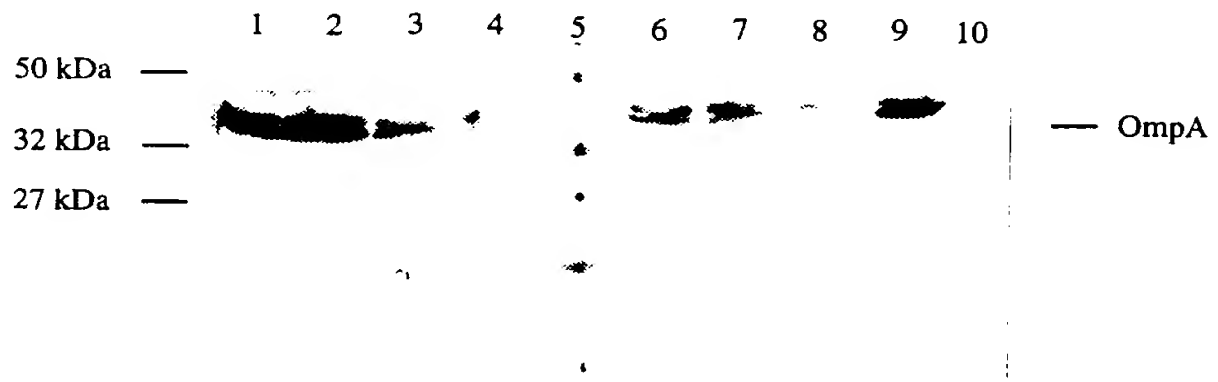
Figur 4b)

6/20



Figur 4c)

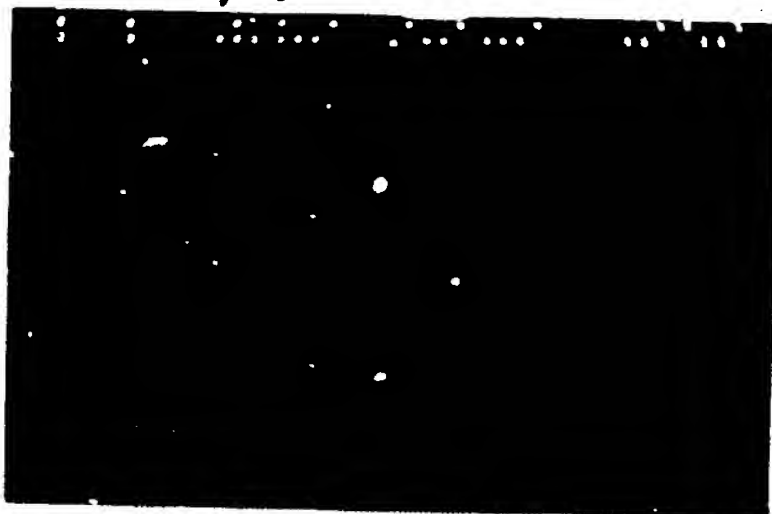
7/28



8/28

Figur 5

a) *E.coli* UT5600 pBA



b) *E.coli* UT5600 pTK1



c) *E.coli* UT5600 pJM7

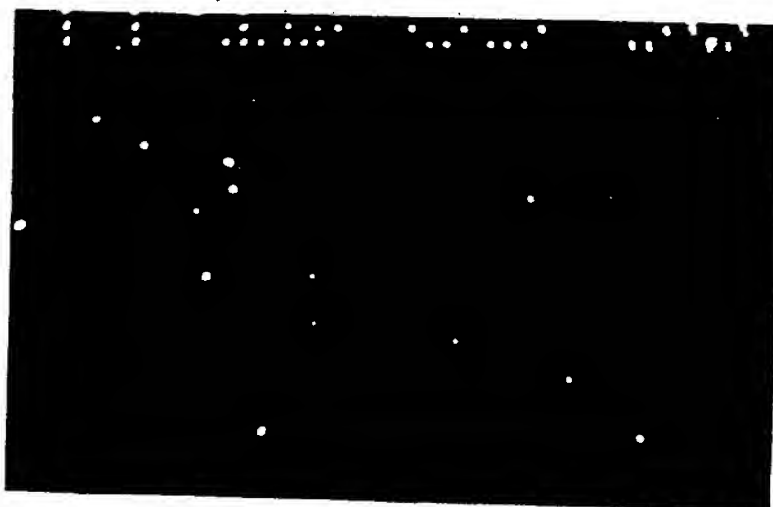


ERSATZBLATT (REGEL 26)

9/28

Figur 5

d) *E.coli* UT5600 pJM22



e) *E.coli* UT5600 pTK61



Figur 6

DNA-Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide 10/28

Name	Verwendung 1)	Länge (bp)	Sequenz (5'-3')
EF16	PCR (+)	36	TGTAAAACGACGGCCAGTATCACGAGG CCCTTTCGT
JM1	PCR (-)	27	GGAAGATCTGCCTCAGAAATGAGGGCC
JM6	PCR (-)	30	CATGGTACCAGGCGTTTTATTATTCCCT AC
JM7	PCR (+)	30	CGGGGTACCCTTAATCCTACAAAAGAA AGT
JM20	PCR (+)	44	AAGGGTACCTTTGAAATACTCCGGAGTA ATATTTTGGAGGTGTTT

1)

(+) und (-) beziehen sich auf den kodierenden (+) bzw. den dazu komplementären DNA-Strang (-).

Figure 7

11/28

```

1  GCATCCGTGTGGATGAAGATCACTGGAGGAATAAGCTCTGGTAAGCTTAATGACGGGCAA
   A S V W M K I T G G I S S G K L N D G Q - 60
61  AATAAAACAACAACCAATCAGTTTATCAATCAGCTCGGGGGGGATATTTATAAATTCAT
   N K T T T N Q F I N Q L G G D I Y K F H - 120
121 GCTGAACAACCTGGGTGATTTTACCTTAGGGATTATGGGAGGATACGCGAATGCAAAAGST
   A E Q L G D F T L G I M G G Y A N A K G - 180
181 AAAACGATAAATTACACGAGCAACAAAGCTGCCAGAAACACACTGGATGGTTATTCTGTCT
   K T I N Y T S N K A A R N T L D G Y S V - 240
241 GGGGTATACGGTACGTGGTATCAGAAATGGGGAATGCAACAGGGCTCTTTGCTGAAACT
   G V Y G T W Y Q N G E N A T G L F A E T - 300
301 TGGATGCAATATAACTGGTTTAATGCATCAGTGAAAGGTGACGGACTGGAAGAAGAAAAA
   W M Q Y N W F N A S V K G D G L E E E K - 360
361 TATAATCTGAATGGTTTAACCGCTTCTGCAGGTGGGGGATATAACCTGAATGTGCACACA
   Y N L N G L T A S A G G G Y N L N V H T - 420
421 TGGACATCACCTGAAGGAATAACAGGTGAATTCTGGTTACAGCCTCATTTCAGGCTGTCT
   W T S P E G I T G E F W L Q P H L Q A V - 480
481 TGGATGGGGGTTACACCGGATACACATCAGGAGGATAACGGAACGGTGGTGCAGGGAGCA
   W M G V T P D T H Q E D N G T V V Q G A - 540
541 GGGAAAAATAATATTCAGACAAAAGCAGGTATTCGTGCATCCTGGAAGGTGAAAAGCACC
   G K N N I Q T K A G I R A S W K V K S T - 600
601 CTGGATAAGGATACCGGGCGGAGGTTCCGTCCTATATAGAGGCAAACCTGGATCCATAAC
   L D K D T G R R F R P Y I E A N W I H N - 660
661 ACTCATGAATTTGGTGTTAAAATGAGTGATGACAGCCAGTTGTTGTTCAGGTAGCCGAAAT
   T H E F G V K M S D D S Q L L S G S R N - 720
721 CAGGGAGAGATAAAGACAGGTATTGAAGGGGTGATTACTCAAAACTTGTTCAGTGAATGGC
   Q G E I K T G I E G V I T Q N L S V N G - 780
781 GGAGTCGCATATCAGGCAGGAGGTACCGGAGCAATGCCATCTCCGGAGCACTGGGGATA
   G V A Y Q A G G H G S N A I S G A L G I - 840
841 AAATACAGCTTC
   K Y S F - 852

```

Figur 8

12/20

CTGCGCCTGCGCGCCGACGCCGGCGGCCATGGGCGCGTACGTTTCAGCGAGCGCCAGCAG
1 L R L R A D A G G P W A R T F S E R Q Q 60
ATCAGCAACCGCCACGCCCGCGCCTACGACCAGACGGTCAGCGGGCTGGAGATCGGCCTG
61 I S N R H A R A Y D Q T V S G L E I G L 120
GACCGTGGCTGGAGCGCGTCGGGCGGGCGCTGGTACGCCGGCGGCCTGCTCGGCTACACC
121 D R G W S A S G G R W Y A G G L L G Y T 180
TATGCCGACCGCACCTATCCCGGCGACGGTGGCGGCAAGGTCAAGGGCCTGCACGTCCGC
181 Y A D R T Y P G D G G G K V K G L H V G 240
GGCTACGCCGCCTATGTCCGGCGATGGCGGCTACTATCTCGACACCGTGCTGCGGCTGGGC
241 G Y A A Y V G D G G Y Y L D T V L R L G 300
CGCTACGATCAGCAATACAACATTGCCGGCACCAGTGGCGGCGCGCTACCGCCGACTAC
301 R Y D Q Q Y N I A G T D G G R V T A D Y 360
CGCACAAAGCGGCGCCGCATGGTCGCTCGAAGCGGGCGCGGTTTCGAGCTGCCCAACGAC
361 R T S G A A W S L E G G R R F E L P N D 420
TGGTTCCGCCGAACCGCAGGCCGAGGTTCATGCTGTGGCGCACGTCAGGCAAGCGCTATCGC
421 W F A E P Q A E V M L W R T S G K R Y R 480
GCCAGCAATGGCCTGCGCGTCAAGGTGGACGCCAACACCGCCACGCTGGGCCCGCCTGGGC
481 A S N G L R V K V D A N T A T L G R L G 540
TTGCGCTTCGGCCGCGCATCGCCCTGGCCGGCGGCAACATCGTGCAGCCCTACGCCAGG
541 L R F G R R I A L A G G N I V Q P Y A R 600
CTCGGCTGGACGCAGGAGTTCAAAAGCACGGGCGATGTGCGCACCAATGGCATTGGCCAT
601 L G W T Q E F K S T G D V R T N G I G H 660
GCCGGCGCAGGCCGCCACGGCCGCGTGGAACTGGGCGCGGGCGTCGACGCCGCGTTGGGC
661 A G A G R H G R V E L G A G V D A A L G 720
AAGGGGCACAACCTCTATGCTTCGTACGAGTACGCGCGGGCGACCGGATCAACATTCCG
721 K G H N L Y A S Y E Y A A G D R I N I P 780
TGGTCGTTCCACGCCGGCTACCGCTACAGCTTC
781 W S F H A G Y R Y S F 813

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Figur 9

13128

```

1  CAAAGCCTGTTTCGCATTAGAAGCCGCACTTGAGGTTATTGATGCCCCACAGCAATCGGAA
   Q S L F A L E A A L E V I D A P Q Q S E 60
61 AAAGATCGTCTAGCTCAAGAAGAAGCGGAAAAACAACGCAAAACAAAAGACTTGATCAGC
   K D R L A Q E E A E K Q R K Q K D L I S 120
121 CGTTATTCAAATAGTGCCTTATCAGAATTATCTGCAACAGTAAATAGTATGCTTTCTGTT
   R Y S N S A L S E L S A T V N S M L S V 180
181 CAAGATGAATTAGATCGTCTTTTGTAGATCAAGCACAATCTGCCGTGTGGACAAATATC
   Q D E L D R L F V D Q A Q S A V W T N I 240
241 GCACAGGATAAAAGACGCTATGATTCTGATGCGTTCCGTGCTTATCAGCAGCAGAAAAACG
   A Q D K R R Y D S D A F R A Y Q Q Q K T 300
301 AACTTACGTCAAATTGGGGTGCAAAAAGCCTTAGCTAATGGACGAATTGGGGCAGTTTTC
   N L R Q I G V Q K A L A N G R I G A V F 360
361 TCGCATAGCCGTTTCAGATAATACCTTTGATGAACAGGTTAAAAATCACGCGACATTAACG
   S H S R S D N T F D E Q V K N H A T L T 420
421 ATGATGTCGGGTTTTGCCCAATATCAATGGGGCGATTTACAATTTGGTGTAACGTGGGA
   M M S G F A Q Y Q W G D L Q F G V N V G 480
481 ACGGGAATCAGTGCAGTAAAATGGCTGAAGAACAAGCCGAAAAATTCATCGAAAAGCG
   T G I S A S K M A E E Q S R K I H R K A 540
541 ATAAATTATGGCGTGAATGCAAGTTATCAGTTCCGTTTAGGGCAATTGGGCATTTCAGCCT
   I N Y G V N A S Y Q F R L G Q L G I Q P 600
601 TATTTTGGAGTTAATCGCTATTTTATTGAACGTGAAAATTATCAATCTGAGGAAGTGAGA
   Y F G V N R Y F I E R E N Y Q S E E V R 660
661 GTGAAAACGCCTAGCCTTGCAATTTAATCGCTATAATGCTGGCATTTCGAGTTGATTATACA
   V K T P S L A F N R Y N A G I R V D Y T 720
721 TTTACTCCGACAGATAATATCAGCGTTAAGCCTTATTTCTTCGTCAATTATGTTGATGTT
   F T P T D N I S V K P Y F F V N Y V D V 780
781 TCAAACGCTAACGTACAAACCACGGTAAATCTCACGGTGTGCAACAACCATTTGGACGT
   S N A N V Q T T V N L T V L Q Q P F G R 840
841 TATTGGCAAAAAGAAGTGGGATTAAAGGCAGAAATTTTACATTTCCAAATTTCCGCTTTT
   Y W Q K E V G L K A E I L H F Q I S A F 900
901 ATCTCAAAATCTCAAGGTTCACTCAAACTCGGCAACAGCAAAATGTGGGCGTGAAATTGGGC
   I S K S Q G S Q L G K Q Q N V G V K L G 960
961 TATCGTTGG
   Y R W 969

```

Figur 10

14/28

ACCTCAATCTACACCACAGTACAGGCAGGATGGGATCATGTATTTGGCAGCGAGGGTGGGA
1 T S I Y T T V Q A G W D H V F G S E G G 60
AATGACTTTTATAGGTTTGTCTGTGGCTTATGCAGGTGCAGCGATGAGCTCTGAGAAGAAA
61 N D F L G F A V A Y A G A A M S S E K K 120
GAACAGCTAGTAAATGGTGCACAAAAGGGAGTAAATCCAGCGGTGGAAATGCCTTTGAA
121 E Q L V N G A Q K G V K S S G G N A F E 180
ATCTCGCTCTACAACCTCTATGTACAAGATGGTGTCTGCTTCTAGCACAGATTTCAAGTAT
181 I S L Y N S Y V Q D G A A S S T D F K Y 240
GGTTTTTATAGTGATAGCGTGGCAAAATTCAGCTTCTTGTGGAACAAGCTTACAATGTTT
241 G F Y S D S V A K F S F L W N K L T M F 300
GGTGAGGACAGCTCTCCTAACATGCAAACTTTGGTTTCACCTTCTCTCAAGAGATTGGT
301 G E D S S P N M Q N F G F T F S Q E I G 360
TATCGCTTCTTGCTAGGAAATCACAACGAGTGGTATATCACTCCACAAGGGCAAGTTGCT
361 Y R F L L G N H N E W Y I T P Q G Q V A 420
TTAGGTTATTTCAACCAAAGCAATATCAAGCAAACCTTAGGAAGCCACTGGCTAAAAGGC
421 L G Y F N Q S N I K Q T L G S H W L K G 480
GAGCAAAGTTCTATCTTCACAGTGCAGGGGCGAATTGGAAGCAACTTTGGTTATAGATTT
481 E Q S S I F T V Q G R I G S N F G Y R F 540
AATCAATTCAGTGAAGACAAGGGCTGGGCTTCAGAGCTTTATTTGGGCTTGTGGTACATC
541 N Q F T E D K G W A S E L Y L G L W Y I 600
GGCGATTATATCAGTGGTGGCAATCTTACCTCGTGTCTGACCTAGGTTCTGTAAACACT
601 G D Y I S G G N L T L V S D L G S V N T 660
TTAAGGACTTTGAGCTCTACTGGTAGATTTGCCTTTAACATTGGTACAAACTTCGTGCTC
661 L R T L S S T G R F A F N I G T N F V V 720
AAAGATAATCATAGATTCTACTTTGATTTTGAAGAAGCTTTGGAGGCAAAATCATCACA
721 K D N H R F Y F D F E R S F G G K I I T 780
GATTACCAATTCAACATTGGCTATCGCTATAACTTTGGCGAAAACAGAAAATACGTTTCT
781 D Y Q F N I G Y R Y N F G E N R K Y V S 840
CTTCTTGCAGGTAGTATGAAAGACACTATCAAAAAAGATGATAAGAAAGAAAACAAAGAA
841 L L A G S M K D T I K K D D K K E N K E 900
GAGACAGAAGAAATTGAG
901 E T E E I E 918

Figur 11

15/28

GAAACCACCATGTGGATTGGTACTGTTGGTGGACATAATGAGCATAATTTAGCTGATAGA
1 E T T M W I R T V G G H N E H N L A D R - 60
CAATTA AAAAACCACAGCTAACAGGATGOTTTATCAGATTGGTGGAGATATTTTGAAGACA
61 Q L K T T A N R M V Y Q I G G D I L K T - 120
AACTTCACTGATCATGATGGCTTGCATGTGGGTATTATGGGAGCTTATGGATATCAGGAT
121 N F T D H D G L H V G I M G A Y G Y Q D - 180
AGCAAAACTCATAATAAGTATACTAGTTATAGTTTACAGAGGAACCTGTGAGCGGTTATACT
181 S K T H N K Y T S Y S S R G T V S G Y T - 240
GCCGGTTTGTACAGTTCTTGGTTTCAGGATGAAAAAGAACGAACAGGTCTATATATGGAT
241 A G L Y S S W F Q D E K E R T G L Y M D - 300
GCTTGGTTGCAGTACAGTTGGTTTAATAATACAGTCAAAGGAGATGGGTTAACTGGTGAG
301 A W L Q Y S W F N N T V K G D G L T G E - 360
AAATATTCCAGCAAAGGAATAACAGGAGCTTTGGAAGCTGGCTATATCTACCCAACCATA
361 K Y S S K G I T G A L E A G Y I Y P T I - 420
CGCTGGACTGCTCATAATAATATTGACAACGCATTGTATCTCAATCCACAAGTCCAGATA
421 R W T A H N N I D N A L Y L N P Q V Q I - 480
ACTAGGCATGGGGTAAAAGCAAACGACTATATTGAACACAATGGCACTATGGTCACATCC
481 T R H G V K A N D Y I E H N G T M V T S - 540
TCTGGGGGCAATAATATTCAAGCAAAATTGGGATTGCGTACATCCTTAATTAGTCAGAGT
541 S G G N N I Q A K L G L R T S L I S Q S - 600
TGTATCGATAAGGAGACTCTTCGTAAGTTGCAACCATTTTGGAAAGTGAATTGGAATGG
601 C I D K E T L R K F E P F L E V N W K W - 660
AGCTCAAAGCAATATGGTGTAAATTATGAATGGCATGTCAAATCACCAGATAGGCAACCGT
661 S S K Q Y G V I M N G M S N H Q I G N R - 720
AATGTGATTGAACTCAAAACTGGTGTGGGGGGCGTCTTGCAGATAACCTAAGCATCTGG
721 N V I E L K T G V G G R L A D N L S I W - 780
GGAAACGTATCTCAGCAATTGGGTAATAACAGTTACAGAGACACCCAAGGTATTTTGGGT
781 G N V S Q Q L G N N S Y R D T Q G I L G - 840
GTGAAATATACCTTC
841 V K Y T F - 855

Figur 12

16/28

```
CTGGGCGAGTTGCGGCTGAATCCGGACGCGCGGCGGCGCTGGGGCGCGGGCTTCGGCGCAA
- - - - -
L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q - 60
CGCCAGCAGCTGGACAACCGCGCGCGGCGGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAG
61 - - - - -
R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E - 120
CTGGGCGCGCGACCAACGCGGTGGCGGTGGCCGCGGACGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
121 - - - - -
L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A - 180
GGCTATACGCGCGCGACCGCGGCTTCACCGCGGACGCGCGGCGGCCACACCGACAGCGTG
181 - - - - -
G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V - 240
CATGTCGGGGGCTATGCCACATATATCGCCGACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACCGCTG
241 - - - - -
H V G G Y A T Y I A D S G F Y L D A T L - 300
CGCGCCAGCGCGCTGGAGAATGACTTCAAGGTGGCGGCGCAGCGACGGGTACCGCGGTCAAG
301 - - - - -
R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K - 360
GGCAAGTACCGCACCCATCGGGTGGGCGCGCTCGCTCGAGGCGGGCGCGCGCTTTACCCAT
361 - - - - -
G K Y R T H G V G A S L E A G R R F T H - 420
GCCGACGGCTGGTTCCTCGAGCCGCGAGCCGAGCTGGCGGTATTCCGGGCGCGCGCGGT
421 - - - - -
A D G W F L E P Q A E L A V F R A G G G - 480
GCGTACCGCGCGGCCAACGGCTGCGGGTGGCGGACGAAGGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
481 - - - - -
A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G - 540
CGCCTGGGCGCTGGAGGTGCGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGCAGGTGCAGCCA
541 - - - - -
R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P - 600
TACATCAAGGCCAGCGTGCTGCAGGASTTCGACGCGCGCGGTACGGTACACACCAACGGC
601 - - - - -
Y I K A S V L Q E F D G A G T V H T N G - 660
ATCGCGCACCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCGGAACTGGGCGCTGGGCATGGCCGCC
661 - - - - -
I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A - 720
GCGCTGGGCGCGCGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCGAAGCTG
721 - - - - -
A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L - 780
GCCATGCGCGTGGACCTTCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
781 - - - - -
A M P W T F H A G Y R Y S W - 822
```

Figur 13

17/28

```

1  CTGGGCGAGTTGGCGCTGAATCCGGACGCCGGCGGGCGCTTGGGGCCGCGGCTTCGCGCAA
   L G E L R L N P D A G G A W G R G F A Q 60
61  CGCCAGCAACTGGACAACCGCGCGCGCGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAG
   R Q Q L D N R A G R R F D Q K V A G F E 120
121 CTGGGCGCGGACCGCGGTGGCGGTGGCGCGCGGGCGCTGGCACCTGGGCGGGCTGGCC
   L G A D H A V A V A G G R W H L G G L A 180
181 GGCTATACGCGCGGCGACCGCGCTTTACCGGCGACGGCGCGGCCACACCGACAGCGTG
   G Y T R G D R G F T G D G G G H T D S V 240
241 CATGTGGGGGCTATGCCACCTATATCGCCAACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTG
   H V G G Y A T Y I A N S G F Y L D A T L 300
301 CGCGCCAGCCGCTCGAAAATGACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGATGGGTACGCGGTCAAG
   R A S R L E N D F K V A G S D G Y A V K 360
361 GGCAAGTACCGCACCCATGGGGTAGGCGTCTCGCTCGAGGCGGGCGGCGCTTCGCCCCAT
   G K Y R T H G V G V S L E A G R R F A H 420
421 GCGACGCGCTGGTTCTCGAGCGCGAGCCGAGCTGGCGGTGTTCCGGGTGCGCGGCGGT
   A D G W F L E P Q A E L A V F R V G G G 480
481 GCGTACCGCGCGGCCAATGGCCTGCGGGTGCGCGACGAAGGCGGCAGCTCGGTGCTGGGT
   A Y R A A N G L R V R D E G G S S V L G 540
541 CGCCTGGGCCTGGAGGTGCGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGTCAGCCCA
   R L G L E V G K R I E L A G G R Q V Q P 600
601 TACATCAAGGCCAGCGTGTTCAGGAGTTGACGCGCGCGGTACGGTACGCACCAACGGC
   Y I K A S V L Q E F D G A G T V R T N G 660
661 ATCGCGCATCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGCGCGGAACTGGGCCTGGGCATGGCCGCG
   I A H R T E L R G T R A E L G L G M A A 720
721 GCGCTGGGCGCGGCGCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGGGCCCGAAGCTG
   A L G R G H S L Y A S Y E Y S K G P K L 780
781 GCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGG
   A M P W T F H A G Y R Y S W 822

```

Figur 14

18/28

1 AAGTTTGGTGGCGTGGATAAGCCCGTTTGTGCGSTAATGCAACGCAGAAGATGTGTAACAGT
K F G A W I S P F V G N A T Q K M C N S 60
61 ATAAGTGSTTATAAGTCTGATACAACCTGGTGGCACTATAGGTTTTGACGGCTTCGTTAGC
I S G Y K S D T T G G T I G F D G F V S 120
121 GATGATCTAGCACTCGGACTTGCATATACAAGAGCCGATACTGACATTAAGCTAAAAAAT
D D L A L G L A Y T R A D T D I K L K N 180
181 AATAAAACGGGCGATAAGAATAAGGTAGAGAGCAACATCTATTCTTTATACGGTTTATAT
N K T G D K N K V E S N I Y S L Y G L Y 240
241 AATGTACCTTATGAAAATCTCTTCGTTGAAGCTATAGCATCTTACTCAGATAATAAGATA
N V F Y E N L F V E A I A S Y S D N K I 300
301 AGAAGCAAATCAAGACGTGTTATTGCAACGACACTAGAGACTGTGCGTTATCAAACCTGCA
R S K S R R V I A T T L E T V G Y Q T A 360
361 AACGGTAAGTATAAATCCGAAAGCTATACAGGTCAAGTTAATGGCTGGTTATACCTATATG
N G K Y K S E S Y T G Q L M A G Y T Y M 420
421 ATGCCTGAGAACATTAACCTTAACACCGCTAGCTGGGCTTAGATATTCGACTATCAAAGAT
M P E N I N L T P L A G L R Y S T I K D 480
481 AAGGGCTATAAGGAAACCGGTACTACTTACCAAATCTTACCGTTAAAGGCAAGAACTAT
K G Y K E T G T T Y Q N L T V K G K N Y 540
541 AATACTTTTCGACGGTTTACTCGGTGCTAAAGTATCAAGTAATATCAATGTCAATGAAATA
N T F D G L L G A K V S S N I N V N E I 600
601 GTGCTAACACCTGAGCTTTACGCAATGGTCGATTATGCATTCAAGAATAAAGTTTCGGCG
V L T P E L Y A M V D Y A F K N K V S A 660
661 ATTGATGCAAGGTTACAAGGTATGACTGCTCCTCTTCCAACCAACAGCTTTAAGCAAAGC
I D A R L Q G M T A P L P T N S F K Q S 720
721 AAAACAAGTTTTGATGTGCGGTGTCGGTGTACTGCTAAGCATAAAATGATGGAATACAGG
K T S F D V G V G V T A K H K M M E Y R 780
781 ATTAACCTACGATACCAATATCGGAAGTAAGTATTTTCGCTCAGCAAGGTAGTGTAAGATT
I N Y D T N I G S K Y F A Q Q G S V K V 840
841 CGTGTTAATTTT
R V N F 852

Figur 15

19/28

```

1  TCTTATGSGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATTGCAGAACAAGACAAAAAAGGTGGT
  S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G 60
51  ATAGCTGGTTATAAAGCAAAACTACTGGGGTTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAGC
  I A G Y K A K T T G V V V G L D T L A S 120
121 GATAACCTAATGATTGGGGCAGCTATTGGGATCACTAAAACTGATATAAAACACCAAGAT
  D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D 180
181 TATAAGAAAGGTGATAAACTGATATTAATGGTTTATCATTCTCTCTATATGGTTCCCAA
  Y K K G D K T D I N G L S F S L Y G S Q 240
241 CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAATTCAATCTTTACCTTAAACAAAGTCAAA
  Q L V K N F F A Q G N S I F T L N K V K 300
301 AGTAAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGAGTCTAATGGTAAGATGAGCAAGCAAATTGCTGCT
  S K S Q R Y F F E S N G K M S K Q I A A 360
361 GGTAAATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAATTTAATATTTGGTTATGATTATAATGCA
  G N Y D N M T F G G N L I F G Y D Y N A 420
421 ATGCCAAATGTATTAGTAACTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAATCTTCTAATGAA
  M P N V L V T P M A G L S Y L K S S N E 480
481 AATTATAAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAAATAAGCGCATTAAATAGCAAATTTAGTGAT
  N Y K E T G T T V A N K R I N S K F S D 540
541 AGAGTCGATTTAATAGTAGGGGCTAAAGTAGCTGGTAGTACTGTGAATATAACTGATATT
  R V D L I V G A K V A G S T V N I T D I 600
601 GTGATATATCCGGAAATTCATTCTTTTGTGGTGCACAAAGTAAATGGTAAATTATCTAAC
  V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S N 660
661 TCTCAGTCTATGTTAGATGGACAAACTGCTCCATTTATCAGTCAACCTGATAGAACTGCT
  S Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A 720
721 AAAACGTCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAACATAAAATCTGATGCTAAGATGGAGTAT
  K T S Y N I G L S A N I K S D A K M E Y 780
781 GGTATCGGTTATGATTTTAATTTCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA
  G I G Y D F N S A S K Y T A H Q G T L K 840
841 GTACGTGTAAACTTC
  V R V N F 855

```

Figur 16

20/28

```

1  GCTTACGGTATATGGGCAAAACCTTTCTATACTGATGCACATCAAAGTAAGAAAGGTGGT
  A Y G I W A K P F Y T D A H Q S K K G G 60
61  TTAGCTGGTTATAAAGCTAAAACCGGCGTGTGTAATCGSTTTAGATACGCTAGCTAAC
  L A G Y K A K T T G V V I G L D T L A N 120
121 GATAATTTAATGATCGGTGCTGCTATCGGTATCACTAAACTGATATAAAACATCAAGAT
  D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D 180
181 TATAAGAAAGGTGATAAAACCGACGTTAACGGTTTCTCATTCTCTCTATATGGTGCCCGAG
  Y K K G D K T D V N G F S F S L Y G A Q 240
241 CAGCTTGTTAAGAAGCTTCTTTGCTCAAGGTAGTGCAATATTTAGCTTAAACCAAGTGAAG
  Q L V K N F F A Q G S A I F S L N Q V K 300
301 AACAAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAACGGTAATATGAGCAAGCAAATTGCTGCC
  N K S Q R Y F F D A N G N M S K Q I A A 360
361 GGTCAATTACGATAACATGACATTTGGTGGTAACCTTAACAGTCGGTTATGATTACAATGCA
  G H Y D N M T F G G N L T V G Y D Y N A 420
421 ATGCAAGGTGTGTTAGTAAGTCCAATGGCAGGACTTAGCTACTTAAAGTCTTCTGACGAA
  M Q G V L V T P M A G L S Y L K S S D E 480
481 AACTACAAAGAAACCGGTACAACAGTTGCAAACAAGCAAGTTAACAGCAAATTTAGCGAT
  N Y K E T G T T V A N K Q V N S K F S D 540
541 AGAACCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAGCCGGCAGTACTATGAACATAACTGATCTT
  R T D L I V G A K V A G S T M N I T D L 600
601 GCGGTATATCCAGAAGTTCACGCTTTTGTGGTTCCACAAAGTAACCGGTAGATTATCTAAA
  A V Y P E V H A F V V H K V T G R L S K 660
661 ACTCAGTCTGTATTAGACGGACAAGTTACTCCGTGTATCAACCAGCCTGACAGAACCCT
  T Q S V L D G Q V T P C I N Q P D R T T 720
721 AAAACATCTTATAATTTAGGTTTAAGTGCAAGCATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAC
  K T S Y N L G L S A S I R S D A K M E Y 780
781 GGAATCGGTTACGATGCTCAGATTTCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTCTAAAA
  G I G Y D A Q I S S K Y T A H Q G T L K 840
841 GTCGGTGTAAACTTC 855
  V R V N F -

```

Figur 17

21/28

```

1  TCTTATGGTGTATGGGCTAAACCTTTCTATAACATCGCAGAACAAGATAAAAAAGGTGGT
  S Y G V W A K P F Y N I A E Q D K K G G - 60
61  CTAGCTGGTTATAAAGCAAAAAGTGGTGGTGTGTAGTTGGTTTAGATACTCTCGCTAAT
  L A G Y K A K T A G V V V G L D T L A N - 120
121 GATAACCTAATGATTGGTGCAGCTATTGGTATCACTAAAAGTACATAAAACACCAAGAT
  D N L M I G A A I G I T K T D I K H Q D - 180
181 TATAAAAAAGGTGATAAAAGTATTAAGGGTTTATCCTTCTCTCTATATGGTGGCCAG
  Y K K G D K T D I K G L S F S L Y G A Q - 240
241 CAGCTTGTTAAGAATTTCTTTGCTCAAGGTAGTGCAATATTTACCTTAAACAAAGTCAAA
  Q L V K N F F A Q G S A I F T L N K V K - 300
301 AGTAAAAGTCAGCGTTACTTCTTCGATGCTAATGGTAAGATGAACAAGCAAATTGCTGCC
  S K S Q R Y F F D A N G K M N K Q I A A - 360
361 GGTAAATTATGATAACATAACATTGCGGTGGAATTTAATGTTTGGTTATGATTATAATGCA
  G N Y D N I T F G G N L M F G Y D Y N A - 420
421 CTGCAAGGTGTATTAGTGACTCCAATGSCAGGGCTTAGCTACTTAAATCTTCTAATGAA
  L Q G V L V T P M A G L S Y L K S S N E - 480
481 AACTATAAAGAAAGTGGTACTACAGTTGCAAATAAGCGCATTACACAGCAAATTTAGTGAT
  N Y K E T G T T V A N K R I H S K F S D - 540
541 AGAATCGATTTAATAGTAGGTGCTAAAGTAACTGGTAGTGCTATGAATATAAATGATATT
  R I D L I V G A K V T G S A M N I N D I - 600
601 GTGATATATCCAGAAATTCATTCTTTTGTAGTGCACAAAGTAAATGGTAAGCTATCTAAG
  V I Y P E I H S F V V H K V N G K L S K - 660
661 GCTCAGTCTATGTTAGATGGACAAAGTGGTCCATTTATCAGTCAGCCTGATAGAACTGCT
  A Q S M L D G Q T A P F I S Q P D R T A - 720
721 AAAACATCTTATAATATAGGCTTAAGTGCAAATATAAGATCTGATGCTAAGATGGAGTAT
  K T S Y N I G L S A N I R S D A K M E Y - 780
781 GGTATCGGTTATGATTTTAATGCTGCAAGTAAATATACTGCACATCAAGGTACTTTAAAA
  G I G Y D F N A A S K Y T A H Q G T L K - 840
841 GTACGTATAAATTTT - 855
  V R I N F -

```

Figur 18

22/28

1 CAGGGGGATGCCGGTGTCTGGGCACGCATAATGAATGGTACCGGTTCCGGCAGATGSGTGAC
Q G D A G V W A R I M N G T G S A D G D 60
TACAGCGATAACTACACTCACGTTTCAGATTGGTGTGACAGAAAGCATGAGCTGGACGGT
61 Y S D N Y T H V Q I G V D R H H E L D G 120
GTGGATTTATTTACGGGGGCATTGCTGACCTATACGGACAGCAATGCAAGCAGCCACGCA
121 V D L F T G A L L T Y T D S N A S S H A 180
TTCAGTGAAAAACAAATCCGTTGGGTGGCGGTCTGTATGCCTCTGCACTCTTTAATTCC
181 F S G K N K S V G G G L Y A S A L F N S 240
GGAGCTTATTTTGACCTGATTGGTAAATATCTCCATCATGATAATCAGCACACGGCGAAT
241 G A Y F D L I G K Y L H H D N Q H T A N 300
TTTGCCTCACTGGGAACAAAAGACTACAGCTCTCATTCCTGGTATGCCGGTGTGGAAGTT
301 F A S L G T K D Y S S H S W Y A G A E V 360
GGTTATCGTTACCACCTGACGAAAGAGTCCTGGGTGGAGCCACAGATAGAGCTGGTTTAC
361 G Y R Y H L T K E S W V E P Q I E L V Y 420
GGTTCTGTATCAGGAAAAGCTTTTGTAGCTGGGAAGCCCGGGAATGGCTCTGAGCATGAAA
421 G S V S G K A F S W E A R G M A L S M K 480
GACAAGGATTATAACCCACTGATTGGCCGTACTGGTGTGACGTGGGAAGAGCCTTCTCC
481 D K D Y N P L I G R T G V D V G R A F S 540
GGAGACGACTGGAAAATCACAGCTCGAGCCGGGCTGGGTATCAGTTCCGACCTGCTGGCG
541 G D D W K I T A R A G L G Y Q F D L L A 600
AACGGAGAAACGGTTCTGCAGGATGCTTCCGAGAGAAACGTTTCGAAGGTGAAAAAGAT
601 N G E T V L Q D A S G E K R F E G E K D 660
AGCAGGATGCTGATGACGGTAGGGATGAATGCGGAAATTAAGGATAATATGCGTTTGGGA
661 S R M L M T V G M N A E I K D N M R L G 720
CTGGAGCTGGAGAAATCAGCGTTCCGGGAAATATAATGTGGATAATGCGATAAACGCCAAC
721 L E L E K S A F G K Y N V D N A I N A N 780
TTCCGTTATGTTTTC
781 F R Y V F 795

Figur 19

23/20

ACCCGTCAACTGTCCGGCCAGATCCACGGCGATATGGCGTCCGCCCCAGATTAAACGAAAGC
T R Q L S G Q I H A D M A S A Q I N E S 60
CGTTATCTSCGCGATACCGCCACCGAGCGGTTGGCGCCAGGCGGATGGCCGCGCGACCGCT
61 R Y L R D T A T E R L R Q A D G R R T A 120
TCCGATATCAAAGCGGATGATAATGGCGCCTGGGCGAAATTGCTGGGCAACTGGGGGCAT
121 S D I K A D D N G A W A K L L G N W G H 180
GCTTCCGGCAACGACAACGCTACCGGTTACCAGACATCCACCTATGGCGTGCTGTTGGGT
181 A S G N D N A T G Y Q T S T Y G V L L G 240
CTGGACAGCGAACTGTTTGACGACGGCGGCTGGGCGTGATGACCGGCTATACCGGCACG
241 L D S E L F D D G R L G V M T G Y T R T 300
TCGCTGGTAGGCGGTCTACAGTCAGTAGTCCACAGCGACACTACACATCTGGGCGTGTAC
301 S L V G G L Q S V V H S D T T H L G L Y 360
GGCGACAAACGCTTCGGCGCGTGGCGCTGCCAGCGGGCGGCACCTATACCTGGCATCGC
361 G D K R F G A L A L P A G G T Y T W H R 420
ATCGACACGTCGCGCTCGGTAAACTACGGCGCGCAGGCGGATCGCGAAAAGGCCCGCTAT
421 I D T S R S V N Y G A Q A D R E K A R Y 480
AACGCGCGCACCGGTCAGCTGTTTATCGAAAGCGGCTACGATTGGAGCAACGACGTGGTC
481 N A R T G Q L F I E S G Y D W S N D V V 540
AATCTTGAGCCGTTCCGCAACCTGGCGTACACCCACTATCGCAACGAGGGGATCAACGAG
541 N L E P F A N L A Y T H Y R N E G I N E 600
CAAGGCGGGGCGGCGGCTGCGCGGCGATAAGCAAAGTCAGTCCGCCACCGCTTCGACG
601 Q G G A A A L R G D K Q S Q S A T A S T 660
CTGGGCGCTGCGCGCGGATACGCAATGGCAGACCGACAGCGTGGCGATCGCCCTGCCGGGC
661 L G L R A D T Q W Q T D S V A I A L P G 720
GAGCTGGGTGGCAACATCAGTACGGCAAGCTGGAGCGTAAACACAGCTGATGTTCAAA
721 E L G W Q H Q Y G K L E R K T Q L M F K 780
CGCAGCGATGTCGCGTTCGACGTGAACAGCGTCCCTGTTTCTCGCGATGGGGCCATTCTG
781 R S D V A F D V N S V P V S R D G A I L 840
AAAGCGGGCGTTCGATGTATCGATTAAACAAAACGTCGTCCCTGTCCCTTGGGTACGGCGGG
841 K A G V D V S I N K N V V L S L G Y G G 900
CAGCTGTCTGTCACCAACCACGAGACAACAGCGTCAACGCGGCGCTGACCTGGCGGTTG
901 Q L S S N H Q D N S V N A G L T W R F 957

Figur 20

24/28

ACCCGTCAACTGTCCGGCCAGATCCACGCGGATATGGCTTCCGCCCAGATCAACGAAAGC
1 T R Q L S G Q I H A D M A S A Q I N E S 60
CGTTACCTGCGCGATACCGCCACCGAGCGCTTGGCGCCAGGCGGAAGGCCGCGCACCCGCT
61 R Y L R D T A T E R L R Q A E G R R T A 120
ACCGACATTAAAGCGGATGACAACGGCCGCTGGGGCGAAACTGCTGGGTAGCTGGGGGCAT
121 T D I K A D D N G A W A K L L G S W G H 180
GCTTCCGGCAACGACAACGCCACCGGTTACCAGACCTCCACCTATGGCGTGCTGTTAGGT
181 A S G N D N A T G Y Q T S T Y G V L L G 240
CTGGACAGCGAACTGTTTGGCGACGGCCGGCTTGGCATGATGACCGGGTATACCCGCACT
241 L D S E L F G D G R L G M M T G Y T R T 300
TCGCTGGATGGAGGTTATCAGTCAGATGCTCACAGCGACAACCTACCATCTGGGGCTGTAC
301 S L D G G Y Q S D A H S D N Y H L G L Y 360
GGCGACAAACGCTTCGGCGCGTTGGCGCTGCGAGCGGGCGGCACCTATACCTGGCATCGC
361 G D K R F G A L A L R A G G T Y T W H R 420
ATCGACACCTCGCGTTCGGTGAACCTACGGCGCGCAGTCGGATCGCGAGAAGGCCAAGTAT
421 I D T S R S V N Y G A Q S D R E K A K Y 480
AACGCGCGCACCGGTCAGCTGTTTCATCGAAAGCGGCTACGATTGGACGAGCGATGCGGTC
481 N A R T G Q L F I E S G Y D W T S D A V 540
AACCTTGAGCCGTTTCGCCAACCTGGCGTATACCCATTACCGTAACGAGGAGATCAACGAG
541 N L E P F A N L A Y T H Y R N E E I N E 600
CAAGCGGGGGCAGCGGCGCTGCGCGCGGACAAACAAAGTCAGTCCGCCACCGCCTCGACG
601 Q G G A A A L R G D K Q S Q S A T A S T 660
TTGGGTCTGCGCGCGGACACCGAGTGGCAAACCGACAGCGTGGCGATCGCGCTGCGCGGC
661 L G L R A D T E W Q T D S V A I A L R G 720
GAGCTGGGTGGCAGCATCAGTACGGCAAGCTGGAGCGTAAAACGAGCTGATGTTCAAA
721 E L G W Q H Q Y G K L E R K T Q L M F K 780
CGCACTGATGCGCGCTTCGACGTGAACAGCGTGCTGTTTCTCGCGATGGCGCGATTCTG
781 R T D A A F D V N S V P V S R D G A I L 840
AAAGCGGGCGTCGATGTATCGATTAAACAAAAACGCCGTCCTGTCCCTTGGCTACGGCGGG
841 K A G V D V S I N K N A V L S L G Y G G 900
CAGCTGTGCTCCAACCACCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGTCTGACCTGGCGCTTC
901 Q L S S N H Q D N S V N A G L T W R F 957

Figur 21

25/28

1 TTCCGTCAGCTGTCGGGGCAAATCCATGCGGACATCGCGTCGGCGCTGGTGAACGACAGC 60
F R Q L S G Q I H A D I A S A L V N D S -
61 CGCTACCTGCGTGAGGCGCTGAACGGGCGTCTGCGTCAGGCGGAAGGGCTGGCGAGCTCG 120
R Y L R E A L N G R L R Q A E G L A S S -
121 TCGGCCATCAAGGCGGACGAGGACGGCGCCTGGGCGCAGCTGCTGGGAGCGTGGGACCAT 180
S A I K A D E D G A W A Q L L G A W D H -
181 GCGTCGGGCGACGCCAACGCCACCGGCTATCAGGCCTCGACCTACGGGGTGCTGGTGGGG 240
A S G D A N A T G Y Q A S T Y G V L V G -
241 CTGGA CTGCGCGCGCGCGGCGGCGGCTGCGGGCTGGGGGTGGCGACCGGCTACACCGCACC 300
L D S A A A A D W R L G V A T G Y T R T -
301 TCGCTGCACGGCGGGTATGGGTGGAAGGCGGACAGCGACAACCTACCACCTGGCGGCGTAC 360
S L H G G Y G S K A D S D N Y H L A A Y -
361 GCGGACAAGCAGTTGCGGGCGCTGCGCGCTGCGGGCGGGGCGGGCTACACCTGGCACCGC 420
G D K Q F G A L A L R G G A G Y T W H R -
421 ATCGACACCAAGCGGTGCGTGAACCTACGGGATGCAGTCGGACCGCGACACGGCGAAGTAC 480
I D T K R S V N Y G M Q S D R D T A K Y -
481 AGCGCGCGCACCGAGCAGCTGTTGCGGGAAGCGGGCTACAGCGTGAAGGGCGAGTGGCTG 540
S A R T E Q L F A E A G Y S V K G E W L -
541 AACCTGGAGCCGTTGCTCAACCTGGCGTACGTGAACCTTTGAAAACAACGGCATCGCGGAA 600
N L E P F V N L A Y V N F E N N G I A E -
601 AGCGGCGGCGCAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAGCAGCACACCGACGCGACGGTGTGACG 660
S G G A A A L R G D K Q H T D A T V S T -
661 CTGGGACTGCGCGCGGACACTGAGTGGCAGGTGAGCCCGGGCAGACGGTGGCGCTGCGC 720
L G L R A D T E W Q V S P G T T V A L R -
721 AGCGAGCTGGGGTGGCAACACCAGTACGGCGGGCTGGAGCGTGGCACCGGGCTGCGGTTT 780
S E L G W Q H Q Y G G L E R G T G L R F -
781 AACGGCGGCAACGCGCCGTTGCTGCTGGACAGCGTGGCGGTGTGCGCGACGGGATGGTG 840
N G G N A P F V V D S V P V S R D G M V -
841 CTGAAGGCGGGTGGCGAAGTGGCGGTGAACGAGAACGCCTGCTGTGCTGGGCTACGGC 900
L K A G A E V A V N E N A S L S L G Y G -
901 GGGCTGCTGTGCGAGAACCATCAGGACAACAGCGTCAACGCCGGCTTCACCTGGCGCTTC 960
G L L S Q N H Q D N S V N A G F T W R F -

Figur 22

26/28

TTCCGTCAGCTGTCCGGGCAAATCCATGCGGACATCGCGTCGGCGCTGGTGAACGACAGC
1 F R Q L S G Q I H A D I A S A L V N D S 60
CGCTACCTGCGTGAGGCGCTGAACGGGCGTCTGCGTCAGGCGGAAGGGCTGGCGAGCTCG
61 R Y L R E A L N G R L R Q A E G L A S S 120
TCGGCCATCAAGGCGGACGAGGACGGCGCCTGGGCGCAGCTGCTGGGAGCGTGGGACCAT
121 S A I K A D E D G A W A Q L L G A W D H 180
GCGTCGGGCGACGCCAACGCCACCGGCTATCAGGCCTCGACCTACGGGCTGCTGGTGGGG
181 A S G D A N A T G Y Q A S T Y G V L V G 240
CTGGA CTGCGCGCGCGCGCGGCGGCTGGCGGCTGGGGGTGGCGACCGGCTACACCGCACC
241 L D S A A A A D W R L G V A T G Y T R T 300
TCGCTGCACGGCGGGTATGGGTGGAAGGCGGACAGCGACA ACTACACCTGGCGGGCTAC
301 S L H G G Y G S K A D S D N Y H L A A Y 360
GGCGACAAGCAGTTCGGGGCGCTGGCGCTGCGGGGCGGGGCGGGCTACACCTGGCACCGC
361 G D K Q F G A L A L R G G A G Y T W H R 420
ATCGACACCAAGCGGTGCGTGA ACTACGGGATGCAGTTCGACCGCGACACGGCGAAGTAC
421 I D T K R S V N Y G M Q S D R D T A K Y 480
AGCGCGCGCACCGAGCAGCTGTTCCGCGAAGCGGGCTACAGCGTGAAGGGCGAGTGGCTG
481 S A R T E Q L F A E A G Y S V K G E W L 540
AACCTGGAGCCGTTCTGTC AACCTGGCGTACGTGA ACTTTGAAAACAACGGCATCGCGGAA
541 N L E P F V N L A Y V N F E N N G I A E 600
AGCGGCGGCGCAGCGGCGCTGCGCGGCGACAAGCAGCACACCGACCGGACGGTGTGACG
601 S G G A A A L R G D K Q H T D A T V S T 660
CTGGGACTGCGCGCGGACACTGAGTGGCAGGTGAGCCCGGGCACGACGGTGGCGCTGCGC
661 L G L R A D T E W Q V S P G T T V A L R 720
AGCGAGCTGGGGTGGCAACACCAGTACGGCGGGCTGGAGCGTGGCACCGGGCTGCGGTTG
721 S E L G W Q H Q Y G G L E R G T G L R F 780
AACGGCGGCAACGCGCCGTTCTGTTGGTGGACAGCGTGC CGGTGTCCGCGACGGGATGGTG
781 N G G N A P F V V D S V P V S R D G M V 840
CTGAAGGCGGGTGC GGAAGTGGCGGTGAACGAGAACGCCTCGCTGTGCTGGGCTACGGC
841 L K A G A E V A V N E N A S L S L G Y G 900
GGGCTGCTGTGCGAGAACCATCAGGACAACAGCGTCAACGCGGGCTTCACCTGGCGCTTC
901 G L L S Q N H Q D N S V N A G F T W R F 960

Figur 23

27/20

ATTAATGGCGAAGCCCGGTACGTGGGTGCGTCTGCTGAACGGTTCCGGCTCTGCTGATGGC
I N G E A G T W V R L L N G S G S A D G 60
GGTTTCACTGACCACTATACCCTGCTGCAGATGGGGGCTGACCGTAAGCAGAACTGGGA
61 G F T D H Y T L L Q M G A D R K H E L G 120
AGTATGGACCTGTTTACCGGCGTGATGGCCACCTACACTGACACAGATGCGTCAGCAGAC
121 S M D L F T G V M A T Y T D T D A S A D 180
CTGTACAGCGGTAAAACAAAATCATGGGGTGGTGGTTTCTATGCCAGTGGTCTGTTCCGG
181 L Y S G K T K S W G G G F Y A S G L F R 240
TCCGGCGCTTACTTTGATGTGATTGCCAAATATATTCACAATGAAAACAAATATGACCTG
241 S G A Y F D V I A K Y I H N E N K Y D L 300
AACTTTGCCGGAGCTGGTAAACAGAACTTCCGCAGCCATTCACTGTATGCAGGTGCAGAA
301 N F A G A G K Q N F R S H S L Y A G A E 360
GTCGGATACCGTTATCATCTGACAGATACGACGTTTGTGTAACCTCAGGCGGAACCTGGTC
361 V G Y R Y H L T D T T F V E P Q A E L V 420
TGGGGAAGACTGCAGGGCCAAACATTTAACTGGAACGACAGTGGAAATGGATGTCTCAATG
421 W G R L Q G Q T F N W N D S G M D V S M 480
CGTCGTAACAGCGTTAATCCTCTGGTAGGCAGAACCGGCGTTGTTTCCGGTAAAACCTTC
481 R R N S V N P L V G R T G V V S G K T F 540
AGTGGTAAGGACTGGAGTCTGACAGCCCGTGCCGGCCTGCATTATGAGTTGATCTGACG
541 S G K D W S L T A R A G L H Y E F D L T 600
GACAGTGCTGACGTTTCATCTGAAGGATGCAGCGGAGAACATCAGATTAATGGCAGAAAA
601 D S A D V H L K D A A G E H Q I N G R K 660
GACAGTCGTATGCTTTACGGTGTGGGGTTAAATGCCCGGTTTGGCGACAATACGCGTTTG
661 D S R M L Y G V G L N A R F G D N T R L 720
GGGCTGGAAGTTGAACGCTCTGCATTTGGTAAATACAACACAGATGATGCGATAAACGCT
721 G L E V E R S A F G K Y N T D D A I N A 780
AATATTCGTTATTCATTC
781 N I R Y S F 798

Figur 24

28/28

1 TCTTTAGAAAGCGCGCGGGAAGTGTGTATCAATTTGCCCTAAATATGAAAAACCCACC
S L E S A A E V L Y Q F A P K Y E K F T 60
61 AATGTTTGGGCTAACGCTATTGGGGGAACGAGCTTGAATAGTGGCGGTAAACGCTTCATTG
N V W A N A I G G T S L N S G S N A S L 120
121 TATGGCACAAGTGC GGCGTAGATGCTTACCTTAACGGGGAAGTGAAGCCATTGTGGGG
Y G T S A G V D A Y L N G E V E A I V G 180
181 GGTTTTGAAGCTATGGTTATAGCTCCTTTAGTAATCAAGCGAACTCTCTTAACCTCTGGG
G F G S Y G Y S S F S N Q A N S L N S G 240
241 GCCAATAACACTAATTTTGGCGTGTATAGCCGTATTTTGGCTAACCCAGCATGAATTTGAC
A N N T N F G V Y S R I F A N Q H E F D 300
301 TTTGAAGCTCAAGGGGCGCTAGGGAGTGATCAATCAAGCTTGAATTTCAAAGCGCTTTA
F E A Q G A L G S D Q S S L N F K S A L 360
361 TTGCGAGATTTGAATCAAAGCTATAATTACTTAGCCATAGCGCTGCAACAAGAGCGAGC
L R D L N Q S Y N Y L A Y S A A T R A S 420
421 TATGGTTATGACTTCGCGTTTTTTAGGAACGCTTTGGTGTAAAACCAAGCGTGGGCGTG
Y G Y D F A F F R N A L V L K P S V G V 480
481 AGCTATAACCATTTAGGTTCAACCAACTTTAAAAGCAACAGCAATCAAAAAGTGGCTTTG
S Y N H L G S T N F K S N S N Q K V A L 540
541 AAAAATGGTGCAAGCAGTCAGCATTTATTCAACGCTAGTGCTAATGTGGAAGCGCGCTAT
K N G A S S Q H L F N A S A N V E A R Y 600
601 TATTATGGGGACACTTCATACTTCTACATGAACGCTGGAGTTTACAAGAGTTGCTAAC
Y Y G D T S Y F Y M N A G V L Q E F A N 660
661 TTTGGTTCTAGCAATGCGGTGTCTTTAAACACCTTTAAAGTGAATGCTACTCGTAACCT
F G S S N A V S L N T F K V N A T R N P 720
721 TTAAATACCCATGCGAGAGTGATGATGGGTGGGGAATTAAAATTAGCTAAAGAAGTGT
L N T H A R V M M G G E L K L A K E V F 780
781 TTGAATTTGGGCTTTGTTTATTGTCACAATTTGATTTCCAATATAGGCCATTTGCTTCC
L N L G F V Y L H N L I S N I G H F A S 840
841 AATTTAGGAATGAGGTATAGTTTC
N L G M R Y S F 864

ERSATZBLATT (REGEL 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/01130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29 June 1995	21,36,37
Y	see page 8, line 1 - page 9, line 25 see page 10, line 26 - page 13, line 30; examples 2-5 --- -/--	1-25, 38-40

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1997

Date of mailing of the international search report

17.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 3280 HV Rijswijk
Tel: (+31 70) 340-2040; Tx: 31 631 ex nl;
Fax: (+31 70) 340-3016

Authorized officer

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/01130

Continuation: DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VACCINE, vol. 12, no. 6, May 1994, pages 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	see the whole document	1,2,9, 10,15, 16,38

X	EMBO J., vol. 11, no. 6, 1992, pages 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgaA-mediated outer membrane transport" see the whole document	21,36,37

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 18, no. 2, 1995, pages 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters" see page 378 - page 380	1-3, 5-10, 20-23, 38-40

Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27 May 1993 see page 6, line 6 - page 10, line 28 see page 12, line 4 - page 13, line 29	1-25

Y	BIO-TECHNOLOGY, vol. 14, no. 2, February 1996, pages 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli" see the whole document	1,2,9-11

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, vol. 17, no. 1, 1995, pages 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion" see the whole document	2,4

	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 96/01130

(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>J. BACTERIOLOGY, vol. 179, no. 3, February 1997, pages 794-804, XP000651378 MAURER, J. ET AL.: "Autodisplay: One-Component System for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli" see the whole document -----</p>	1-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/01130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9517509 A	29-06-95	DE 4344350 A EP 0731837 A	29-06-95 18-09-96
WO 9310214 A	27-05-93	US 5348867 A CA 2123676 A EP 0746621 A	20-09-94 27-05-93 11-12-96

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/01130

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/62 C12N15/65 C12N15/70 C07K16/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 17509 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 29. Juni 1995	21, 36, 37
Y	siehe Seite 8, Zeile 1 - Seite 9, Zeile 25 siehe Seite 10, Zeile 26 - Seite 13, Zeile 30; Beispiele 2-5 ---	1-25, 38-40
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen und der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgetücht)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungsmäßiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. März 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17.04.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 3818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel.: (+31-70) 340-2040, Ex. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Medienstichter

Donath, C

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VACCINE, Bd. 12, Nr. 6, Mai 1994, Seiten 492-498, XP000651455 RUPPERT, A. ET AL.: "OmpA-FMDV VP1 fusion proteins: production, cell surface exposure and immune responses to the major antigenic domain of foot-and-mouth disease virus"	21,36,37
Y	siehe das ganze Dokument	1,2,9, 10,15, 16,38

X	EMBO J., Bd. 11, Nr. 6, 1992, Seiten 2327-2335, XP002028468 KLAUSER, T. ET AL.: "Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria IgA-mediated outer membrane transport"	21,36,37
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 18, Nr. 2, 1995, Seiten 377-382, XP000651438 JOSE, J. ET AL.: "MicroCorrespondence: Common structural features of IgA1 protease-like outer membrane protein autotransporters"	1-3, 5-10, 20-23, 38-40
	siehe Seite 378 - Seite 380	

Y	WO 93 10214 A (GEORGIU, G.) 27.Mai 1993 siehe Seite 6, Zeile 6 - Seite 10, Zeile 28 siehe Seite 12, Zeile 4 - Seite 13, Zeile 29	1-25

Y	BIO-TECHNOLOGY, Bd. 14, Nr. 2, Februar 1996, Seiten 203-208, XP002028469 CORNELIS, P. ET AL.: "Development of new cloning vectors for the production of immunogenic outer membrane fusion proteins in Escherichia coli"	1,2,9-11
	siehe das ganze Dokument	

Y	MOLECULAR MICROBIOLOGY, Bd. 17, Nr. 1, 1995, Seiten 123-135, XP000651454 BENJELLOUN-TOUIMI, Z. ET AL.: "SepA, the major extracellular protein of Shigella flexneri: autonomous secretion and involvement in tissue invasion"	2,4
	siehe das ganze Dokument	

	-/--	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/01130

(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	<p>J. BACTERIOLOGY, Bd. 179, Nr. 3, Februar 1997, Seiten 794-804, XP000651378 MAURER, J. ET AL.: "Autodisplay: One-Component System for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from Escherichia coli" siehe das ganze Dokument -----</p>	1-38

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/01130

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9517509 A	29-06-95	DE 4344350 A	29-06-95
		EP 0731837 A	18-09-96
WO 9310214 A	27-05-93	US 5348867 A	20-09-94
		CA 2123676 A	27-05-93
		EP 0746621 A	11-12-96

